

## Table des matières

Remerciements .....	3
INTRODUCTION .....	10
I. PRESENTATION DE L'ETUDE .....	13
I.1. Sélection génétique et résistance aux maladies.....	13
I.1.1. Considérations générales .....	13
I.1.2. La sélection pour une résistance accrue aux mammites .....	14
I.1.3. La sélection sur le critère CCS.....	14
I.2. Infestation par <i>Haemonchus contortus</i> et réponse immunitaire de l'hôte ....	17
I.2.1. Biologie et cycle de <i>Haemonchus</i> .....	17
I.2.2. Réponse immunitaire .....	18
I.3. Phénotypage des cellules.....	19
I.4. Objectifs et intérêts de l'étude .....	19
II. MATERIEL ET METHODES .....	21
II.1. Animaux .....	21
II.2. Infestations expérimentales.....	22
II.3. Prélèvements .....	23
II.3.1. Dénombrement des œufs de <i>Haemonchus</i> .....	24
II.3.2. Sang .....	24
II.4. Numération et formule sanguine .....	24
II.5. Phénotypage par cytométrie de flux .....	24
II.5.1. Purification des cellules mononucléées .....	24
II.5.2. Numération des cellules.....	24
II.5.3. Immunomarquage des cellules et analyse FACS .....	25
II.6. Prélèvements nécropsiques .....	26
II.6.1. Déroulement des autopsies .....	26
II.6.2. Isolement des cellules des nœuds lymphatiques, marquage et analyse en cytométrie .....	26
II.6.3. Récupération et analyse du contenu abomasal .....	27

II.7.	Autres analyses .....	27
II.7.1.	Hématocrite.....	27
II.7.2.	Pepsinogène.....	27
II.7.3.	Tests ELISA.....	27
III.	RESULTATS.....	29
III.1.	Excrétion d'œufs au cours des réponses primaire et mémoire.....	29
III.1.1.	Réponse primaire.....	29
III.1.2.	Réponses secondaire et mémoire .....	31
III.2.	Variation des populations cellulaires sanguines .....	32
III.2.1.	Leucocytes totaux.....	32
III.2.2.	Principales populations cellulaires sanguines.....	33
III.3.	Immunophénotypage.....	36
III.3.1.	Numération des cellules.....	36
III.3.2.	Proportion des sous-populations cellulaires analysées en cytométrie (résultats exprimés en %) .....	38
III.3.3.	Résultats en nombre absolu de cellules .....	48
III.4.	Analyse des cellules du nœud lymphatique drainant la caillette.....	57
III.4.1.	Poids des nœuds lymphatiques .....	57
III.4.2.	Phénotypage des cellules .....	58
III.5.	Autres résultats .....	64
III.5.1.	Pepsinogène sanguin .....	64
III.5.2.	Hématocrite.....	65
III.5.3.	Infestation parasitaire.....	67
III.5.4.	Poids des animaux.....	67
III.5.5.	Réponse anticorps : tests ELISA .....	68
III.6.	Bilan des résultats .....	70
IV.	DISCUSSION .....	71
IV.1.	Comparaison du niveau d'infestation parasitaire entre les deux groupes de sélection .....	71
IV.1.1.	Excrétion parasitaire .....	71
IV.1.2.	Pepsinogène sanguin .....	72
IV.1.3.	Hématocrite.....	73
IV.1.4.	Bilans parasitaires de fin d'infestation.....	74

IV.2. Effecteurs cellulaires de la réponse immunitaire .....	75
IV.2.1. Réponse immédiate (1 <sup>ère</sup> et 2 <sup>ème</sup> infestations).....	75
IV.2.2. Réponse mémoire (3 <sup>ème</sup> infestation).....	78
CONCLUSION.....	81
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	82
ANNEXES .....	86
ANNEXES .....	86
Annexe 1 : Comptage des œufs de Haemonchus dans les fèces par la méthode de Mac Master. ....	86
Annexe 2 : Extraction des PBMC par la méthode du gradient de Ficoll. ....	86
Annexe 3 : Protocole de marquage des PBMC.....	86
Annexe 4 : Caractéristiques techniques des anticorps utilisés.....	87
Annexe 5 : Dosage du pepsinogène réalisé à partir du sérum par la méthode décrite par Dorny et Vercruysse (1998).....	87
Annexe 6 : Lecture des ELISA. ....	87
Annexe 7 : répartition des individus fortement excréteurs selon leurs pères.....	88
Annexe 8 : répartition des individus faiblement excréteurs selon leurs pères. ....	89

## Table des illustrations

### Figures

Figure 1 : Indexation des reproducteurs et obtention des deux lignées CCS+ et CCS- .....	16
Figure 2 : Cycle de <i>Haemonchus contortus</i> chez le mouton.....	18
Figure 3 : Représentation des différentes infestations expérimentales dans le temps. .....	22

### Tableaux

Tableau 1 : Ascendance des moutons utilisés dans l'expérimentation.....	21
Tableau 2 : Planning des différentes interventions et prélèvements.....	23
Tableau 3 : Comparaison entre le nombre de cellules mononucléées observé et le nombre théorique dans le sang ( $\times 10^6$ dans 5 ml de sang).....	52
Tableau 4 : Compositions du sang et du nœud lymphatique abomasal. ....	64
Tableau 5 : Résumé des différences significatives obtenues entre les valeurs des deux groupes.....	70

### Graphiques

Graphique 1 : Evolution du nombre d'œufs excrétés par gramme de fèces lors des deux premières infestations : valeurs moyennes sur les deux groupes.....	30
Graphique 2 : Evolution du nombre d'œufs excrétés par gramme de fèces lors des deux premières infestations : comparaison des groupes CCS+ et CCS-. ....	30
Graphique 3 : Evolution du nombre d'œufs excrétés par gramme de fèces lors des trois infestations : évolution moyenne sur les deux groupes.....	31
Graphique 4 : Evolution du nombre d'œufs excrétés par gramme de fèces lors des trois infestations : comparaison des groupes CCS+ et CCS-. ....	32
Graphique 5 : Evolution de la concentration sanguine en leucocytes au cours des trois infestations : comparaison des groupes CCS+ et CCS-. ....	33
Graphique 6 : Evolution de la concentration sanguine en granulocytes éosinophiles au cours des trois infestations : comparaison des groupes CCS+ et CCS-.....	34
Graphique 7 : Evolution de la concentration sanguine en lymphocytes au cours des trois infestations : comparaison des groupes CCS+ et CCS-. ....	36
Graphique 8 : Evolution moyenne du nombre de cellules mononucléées récupérées après extraction au Ficoll au cours des trois infestations. ....	37

Graphique 9 : Evolution du nombre de cellules mononucléées récupérées après extraction au Ficoll au cours des trois infestations : comparaison entre le groupe CCS+ et le groupe CCS-.....	38
Graphique 10 : Pourcentage de lymphocytes T (CD2+) parmi les cellules mononucléées au cours des trois infestations : comparaison entre le groupe CCS+ et le groupe CCS-.....	39
Graphique 11 : Evolution de l'intensité moyenne de fluorescence du marqueur CD2 au cours des trois infestations : comparaison des groupes CCS+ et CCS-.....	40
Graphique 12 : Pourcentage de lymphocytes T CD4+ parmi les lymphocytes T au cours des trois infestations : comparaison entre le groupe CCS+ et le groupe CCS-.....	41
Graphique 13 : Evolution de l'intensité moyenne de fluorescence du marqueur CD4 au cours des trois infestations : comparaison des groupes CCS+ et CCS-.....	42
Graphique 14 : Pourcentage de lymphocytes T CD8+ parmi les lymphocytes T au cours des trois infestations : comparaison entre le groupe CCS+ et le groupe CCS-.....	43
Graphique 15 : Evolution moyenne du rapport CD4/CD8 au cours des trois infestations.....	44
Graphique 16 : Evolution du rapport CD4/CD8 au cours des trois infestations : comparaison des groupes CCS+ et CCS-.....	44
Graphique 17 : Valeurs de l'intensité de fluorescence moyenne du marqueur CD44 à J14 et J34 de la seconde infestation : comparaison des groupes CCS+ et CCS-....	46
Graphique 18 : Evolution du nombre de cellules mononucléées comptabilisées d'après la numération-formule sanguine au cours des trois infestations : évolution moyenne sur les deux groupes.....	49
Graphique 19 : Evolution du nombre de cellules mononucléées comptabilisées d'après la numération-formule sanguine au cours des trois infestations : comparaison des groupes CCS+ et CCS-.....	49
Graphique 20 : Evolution du nombre de cellules mononucléées récupérées après extraction au Ficoll au cours des trois infestations : évolution moyenne sur les deux groupes.....	50
Graphique 21 : Evolution du nombre de cellules mononucléées récupérées après extraction au Ficoll au cours des trois infestations : comparaison des groupes CCS+ et CCS-.....	51
Graphique 22 : Evolution du nombre de lymphocytes CD2 <sup>+</sup> au cours des trois infestations : comparaison des groupes CCS+ et CCS-.....	53
Graphique 23 : Evolution du nombre de lymphocytes T CD4 <sup>+</sup> au cours des trois infestations : comparaison des groupes CCS+ et CCS-.....	54

Graphique 24 : Evolution du nombre de lymphocytes T CD8 <sup>+</sup> au cours des trois infestations : comparaison des groupes CCS+ et CCS-.....	55
Graphique 25 : Nombre de lymphocytes T γδ à J14 et J34 de la seconde infestation : comparaison des groupes CCS+ et CCS-.....	56
Graphique 26 : Pourcentage de lymphocytes CD2 <sup>+</sup> dans le nœud lymphatique abomasal en fin de seconde et de troisième infestation : comparaison des groupes CCS+ et CCS-.....	58
Graphique 27 : Pourcentages de lymphocytes T CD4 <sup>+</sup> et CD8 <sup>+</sup> dans le nœud lymphatique abomasal en fin de seconde infestation : comparaison des groupes CCS+ et CCS-.....	60
Graphique 28 : Pourcentages de lymphocytes T CD4 <sup>+</sup> et CD8 <sup>+</sup> dans le nœud lymphatique abomasal en fin de troisième infestation : comparaison des groupes CCS+ et CCS-.....	60
Graphique 29 : Intensité moyenne de fluorescence du marqueur CD44 dans le nœud lymphatique abomasal en fin de seconde et de troisième infestation : comparaison des groupes CCS+ et CCS-.....	61
Graphique 30 : Pourcentage de lymphocytes B dans le nœud lymphatique abomasal en fin de seconde et de troisième infestation : comparaison des groupes CCS+ et CCS-.....	62
Graphique 31 : Pourcentages de lymphocytes B CD5 <sup>+</sup> et CD21 <sup>+</sup> dans le nœud lymphatique abomasal en fin de troisième infestation : comparaison des groupes CCS+ et CCS-.....	63
Graphique 32 : Evolution du pepsinogène sanguin au cours des trois infestations : comparaison des groupes CCS+ et CCS-.....	65
Graphique 33 : Evolution de l'hématocrite au cours des trois infestations : comparaison des groupes CCS+ et CCS- (données de la machine).....	66
Graphique 34 : Evolution du taux d'anticorps anti-produit d'excrétion-sécrétion adulte au cours des trois infestations : comparaison des groupes CCS+ et CCS-.....	68
Graphique 35 : Evolution du taux d'anticorps anti-larves L3 au cours des trois infestations : comparaison des groupes CCS+ et CCS-.....	69

## INTRODUCTION

Les infections mammaires sont un problème d'importance majeure au sein des troupeaux laitiers, quelle que soit l'espèce. Ces affections ont des répercussions sur l'économie de l'élevage, en raison de la perte quantitative de lait, les pénalités au paiement du lait et les coûts induits par les traitements ou la réforme anticipée ; par ailleurs, elles ont des conséquences en aval sur la transformation du lait, en raison d'une qualité sanitaire du lait dégradée et des modifications des capacités de transformation à la suite de la modification de la composition physico-chimique, ou de la présence de résidus antibiotiques.

Depuis de nombreuses années déjà des mesures ont été prises pour limiter l'incidence des infections mammaires [1, 2], en particulier par l'amélioration des conditions zootechniques qui entourent cette production :

L'alimentation, avec non seulement la couverture des besoins énergétiques mais aussi le respect de la balance énergie / azote.

Le logement, en particulier la maîtrise de l'hygiène, des conditions de ventilation et d'hygrométrie des locaux, ainsi que le contrôle de la densité animale. Le non-respect des recommandations qui ont été établies peut être à l'origine de contaminations par des bactéries de l'environnement comme *Escherichia coli*.

Le moment de la traite, à la fois par le réglage et l'entretien de la machine et la technique de traite en lui-même est un point clé pour la transmission des germes : en effet, la contamination d'un quartier sain par un quartier contaminé est possible via le manipulateur ou les manchons trayeurs. Ce cas de figure concerne essentiellement les bactéries à localisation cutanée, principalement *Staphylococcus aureus*.

Tous ces postes sont aujourd'hui assez bien maîtrisés [3]. Cependant ces mesures ne suffisent pas toujours, et la volonté actuelle est d'intervenir plus en amont sur la résistance de l'animal à ces infections.

Outre la diminution de l'incidence des infections, le recours aux médicaments pourrait être moins fréquent ; c'est pourquoi de nouvelles approches pour diminuer encore l'impact non seulement des mammites mais des maladies en général dans les élevages sont envisagées. La sélection génétique est une des approches les plus prometteuses [4]. Déjà utilisée pour améliorer les performances de production des animaux [5], la sélection génétique s'intéresse également au domaine de la résistance aux maladies.

Il faut savoir que la capacité de résistance aux infections est très variable entre individus. De plus, les gènes qui contrôlent cette résistance sont probablement nombreux et leur localisation encore peu connue [6].

Afin de sélectionner des animaux dont la résistance aux infections serait meilleure, il convient de disposer d'un outil fiable pour apprécier la résistance à une infection. Dans le cas des infections mammaires, il existe un critère qui est facilement mesurable et bien corrélé à la présence d'une infection dans la mamelle : il s'agit du comptage des cellules somatiques, ou CCS. Les individus dont la mamelle est colonisée par des bactéries ont des CCS élevés, en conséquence des réactions immunitaire et inflammatoire qui s'y développent. A l'inverse, les animaux qui ont des CCS faibles n'hébergent pas de bactéries, leur mamelle est saine [7].

Afin d'évaluer les effets d'une sélection génétique sur ce critère, une équipe de la Station d'Amélioration Génétique des Animaux (SAGA) de l'INRA (Institut National de Recherche Agronome) a créé deux lignées de brebis par sélection divergente sur le critère CCS. Diverses expérimentations ont été réalisées, en premier lieu afin d'évaluer l'effet de cette sélection sur la résistance aux mammites cliniques et les CCS. Ces études ont montré que la sélection sur le critère CCS avait effectivement permis la création de deux groupes de brebis dont la sensibilité aux mammites est très différente.

Cependant si la sélection s'est avérée efficace dans la diminution de la sensibilité aux mammites, l'effet sur la capacité de réponse de ces animaux à d'autres infections n'est pour l'instant pas connu.

Le sujet qui nous intéresse, est donc l'évaluation de l'effet de cette sélection sur la réponse à une infestation parasitaire. En effet, les modalités de la réponse immunitaire sont différentes selon l'agent pathogène impliqué : une bactérie entraînera une réponse immunitaire principalement de type Th1 surtout associée à une réponse cellulaire, tandis qu'un parasite tel qu'un nématode provoque une réponse de type Th2, que l'on considère plutôt comme associée à une réponse humorale.

Il est donc important de savoir si la sélection génétique visant à améliorer la résistance aux infections mammaires bactériennes n'a pas induit une détérioration de la capacité de réponse des animaux à d'autres maladies dont l'importance en élevage peut être toute aussi capitale.

Dans certaines régions d'élevage, les infestations parasitaires sont aujourd'hui fréquentes et obligent à administrer fréquemment des antihelminthiques [8].

Cependant la résistance naturelle des animaux est un facteur déterminant ; car les traitements chimiques permettent de diminuer la charge parasitaire, mais ils ne sont pas efficaces à 100% ; en outre des résistances aux anthelminthiques sont de plus en plus souvent observées [9, 10]. Il est donc important de préserver la capacité naturelle des animaux à développer une réponse immunitaire protectrice [11].

Notre étude vise à décrire et à comparer les réponses immunitaires de deux groupes d'animaux sélectionnés pour leur sensibilité ou leur résistance aux mammites subcliniques. Trois infestations successives par *Haemonchus contortus* ont été utilisées pour éprouver la résistance d'ovins mâles issus de la sélection divergente sur les CCS. Différents paramètres ont été mesurés au cours de l'infestation. Certains paramètres permettent de connaître l'intensité de l'infestation parasitaire (excrétion fécale d'œufs) ou les lésions induites dans les tissus qui hébergent le parasite au stade larvaire (dosage du pepsinogène, hématocrite). D'autres paramètres ont été mesurés afin d'identifier la présence de différences dans les mécanismes immunitaires de défense de ces animaux (cellules sanguines en particulier des granulocytes éosinophiles). A travers l'analyse de différentes populations de lymphocytes qui sont détectées après immunomarquage et analyse en cytométrie, nous avons recherché des modifications de la composition cellulaire sanguine et l'activation des cellules associées aux réponses primaire et mémoire à la suite d'une infestation par *Haemonchus contortus*.

# **I. PRESENTATION DE L'ETUDE**

## **I.1. Sélection génétique et résistance aux maladies**

### **I.1.1. Considérations générales**

Les progrès techniques en termes de conduite de troupeau et d'agencement des bâtiments d'élevage ont déjà fortement participé à la diminution de l'apparition et de l'expression de nombreuses maladies.

Aujourd'hui se profile une approche plus centrée sur l'animal visant à diminuer la sensibilité des animaux en les sélectionnant génétiquement pour une plus grande résistance aux maladies.

Il convient de se poser plusieurs questions lorsque l'on souhaite sélectionner pour la résistance aux maladies dans un troupeau [12]. La durabilité, la faisabilité et le caractère désirable ou non de cette sélection sont trois points clés [13].

Sous la pression de la sélection naturelle, dans un environnement considéré comme n'évoluant pas, la résistance aux maladies est stable.

La faisabilité dépend de l'héritabilité du caractère utilisé pour mesurer la résistance aux maladies, qui est forte pour les caractères usuellement recherchés, mais aussi de la variation interindividuelle, qui est souvent très forte.

La sélection est désirable ou non selon qu'il existe des interférences avec d'autres caractères économiquement importants : par exemple, chez la vache laitière, il existe une corrélation négative entre la capacité de production de lait et la résistance aux mammites [14]. Dans ce cas, il est souhaitable d'indexer les différents traits de caractère et les associations défavorables afin de minimiser les effets indésirables.

Des modèles stochastiques peuvent être utilisés pour prévoir, dans une certaine mesure, les conséquences d'une sélection sur la résistance à une maladie [15].

Il faut en même temps garder en mémoire le risque d'obtenir une population très homogène génétiquement, qui est associé à une plus grande probabilité de subir une épidémie importante [16].

La part de résistance aux maladies qui est liée à la réponse immunitaire est supposée grande ; elle fait intervenir des composants de l'immunité innée et de l'immunité acquise. L'immunité innée représente la capacité de l'animal à répondre à l'infection en l'absence de pré-exposition. Elle est rapide et fait intervenir des défenses non spécifiques. Elle permet de lutter contre de très nombreux pathogènes. L'immunité acquise se développe plus lentement lors de la réponse primaire, mais lors des infections ultérieures, elle est plus rapide grâce à l'intervention de cellules mémoires. Elle est beaucoup plus spécifique du pathogène que la réponse innée.

Dans la plupart des infections la réponse immunitaire résulte d'une combinaison des deux réponses, primaire et secondaire. Cela a pour conséquence que toute sélection sur la capacité de réponse à un type donné d'agent infectieux aura des répercussions sur la capacité de résistance à d'autres maladies.

### **I.1.2. La sélection pour une résistance accrue aux mammites**

Les mammites ont une importance capitale puisqu'elles sont à l'origine de pertes économiques en élevage laitier, mais aussi pour la filière laitière en général. En effet une mammite subclinique chez une vache ou une brebis entraîne une sous-production de lait, donc une perte directe de revenus pour l'éleveur. De plus les éleveurs sont tenus de respecter un plafond maximum de la concentration des cellules dans le lait livré à l'industrie, au-delà duquel le prix de paiement du lait diminue très significativement. Enfin, les laits à comptages cellulaires élevés traduisent une inflammation de la mamelle qui est à l'origine d'un changement de perméabilité et des capacités de synthèse protéique des tissus ; ces modifications entraînent des changements de la composition du lait, en particulier celle des caséines qui sont les protéines importantes dans la transformation fromagère : il y a une diminution des caséines et une augmentation des protéines solubles, ce qui diminue les aptitudes fromagères du lait [17].

Les cellules somatiques sont représentées majoritairement par des leucocytes (par ordre décroissant d'importance : granulocytes neutrophiles, lymphocytes et macrophages). Leur présence en trop grand nombre dans le lait est signe d'une infection de la mamelle [7] qui n'est souvent pas visible au moment de l'examen clinique de l'animal. On parle alors de mammite subclinique.

Le comptage des cellules somatiques est réalisé le plus souvent via le contrôle laitier, sous forme de comptage individuel ou sur le lait de tank au moment de la collecte. Les enregistrements individuels des CCS constituent une base de données qui peut être utilisée pour la sélection génétique sur ce critère.

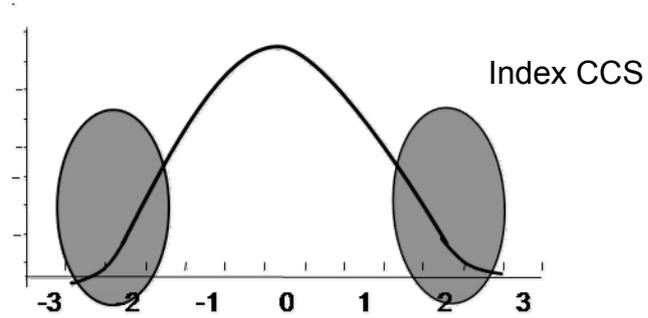
### **I.1.3. La sélection sur le critère CCS**

Le comptage des cellules somatiques est utilisé depuis un certain temps chez la vache laitière afin de détecter précocement les mammites [18]. Il est inclus dans les critères de sélection génétique, et on sait qu'il existe une très forte variabilité interindividuelle sur le critère CCS, et qu'il est faiblement héritable : entre 0,06 et 0,12 chez la vache laitière [19, 20], entre 0,12 et 0,24 chez la brebis [21]. Chez la brebis laitière, le comptage des cellules somatiques est utilisé de la même manière que chez la vache, et la sélection sur ce critère commence à voir le jour [22].

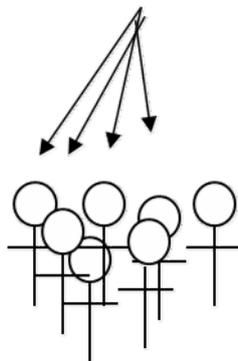
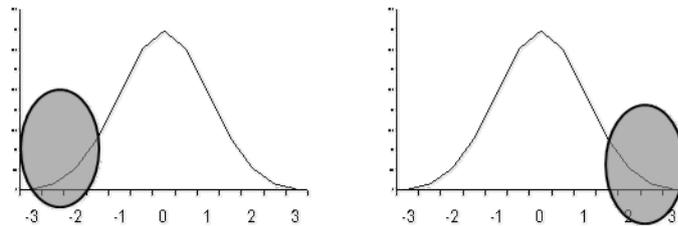
Afin de pouvoir observer les effets de la sélection génétique sur les CCS dans le but d'améliorer la résistance aux mammites, une équipe de la SAGA de l'INRA a réalisé une sélection de brebis et de béliers basée sur le critère CCS. Des béliers appartenant aux unités de sélection ovines de la race Lacaune ont été indexés grâce aux informations disponibles sur leur descendance, les mères ont été choisies parmi celles disponibles dans l'unité expérimentale INRA ; les extrêmes ont été croisés par insémination artificielle de façon à créer deux groupes d'index CCS théoriques très différents : c'est le noyau de la sélection divergente, à partir duquel plusieurs générations vont être produites.

Ainsi la première génération a été obtenue en indexant les géniteurs mâles pour les CCS et en croisant les individus dont la valeur de l'index génétique estimé était extrême (Figure 1). Les filles ainsi obtenues peuvent être séparées en deux groupes appelés « CCS faibles » et « CCS élevés », et les agneaux mâles obtenus en parallèle sont ceux utilisés dans notre expérimentation.

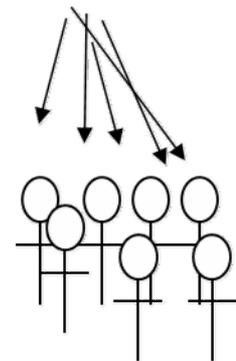
Mâles  
Nombre : 2x7



Femelles



CCS élevés



CCS faibles

**Figure 1** : Indexation des reproducteurs et obtention des deux lignées CCS+ et CCS-

## **I.2. Infestation par *Haemonchus contortus* et réponse immunitaire de l'hôte**

### **I.2.1. Biologie et cycle de *Haemonchus***

*Haemonchus contortus* est un parasite de la famille des Trichostrongilidae. Il suit un cycle monoxène direct, c'est-à-dire que son cycle fait intervenir un seul hôte.

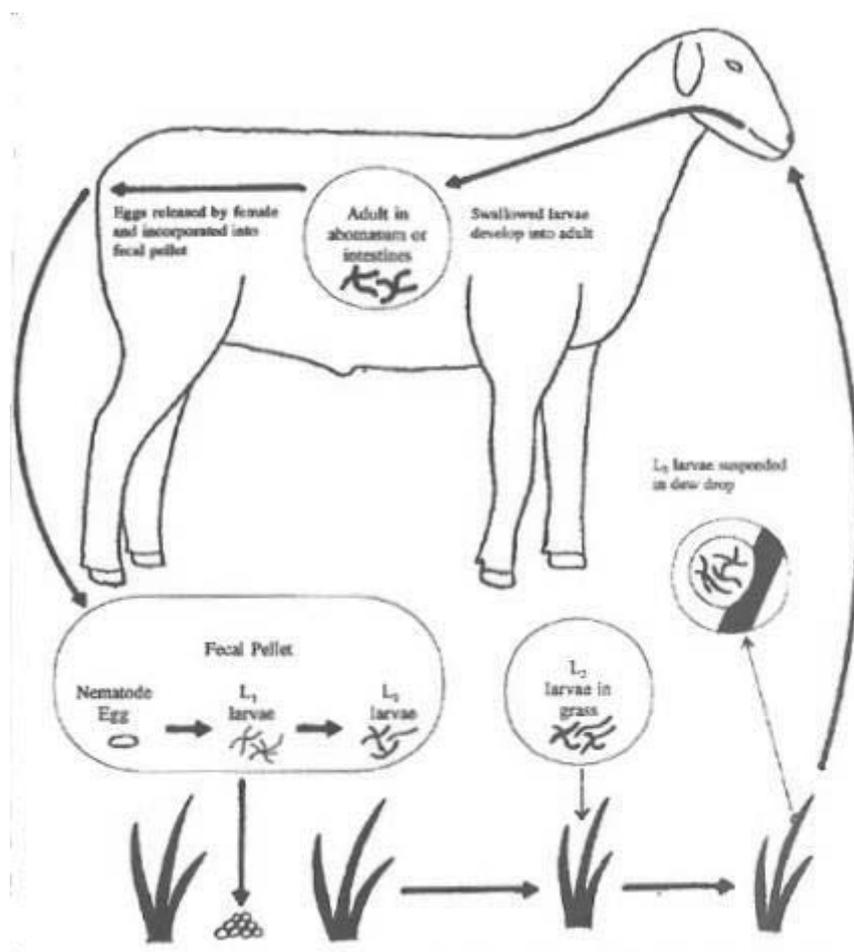
L'adulte se localise dans la caillette des petits ruminants. La femelle adulte mesure 10 à 30 mm de long et peut pondre jusqu'à 5 à 10 000 œufs par jour qui gagnent le milieu extérieur via les excréments.

Les œufs se développent en larves en quelques jours, à condition que les conditions extérieures soient satisfaisantes.

La larve L3 infestante est ensuite ingérée par l'hôte. Elle peut aussi survivre un certain temps dans le milieu extérieur si les conditions ne sont pas trop défavorables (larves transhivernantes).

Les larves pénètrent ensuite à l'intérieur de la muqueuse abomasale et évoluent en larves L4 en 48 heures. A ce moment-là, les L4 sortent dans la lumière, se fixent alors à la paroi et commencent à se nourrir de sang. Enfin les larves au dernier stade immature L5 évoluent en adultes hématophages.

Le cycle total dure environ 21 jours (Figure 2). Les conditions environnementales, en particulier la température et l'hygrométrie, sont déterminantes sur la rapidité d'éclosion des œufs et la viabilité des larves.



**Figure 2 : Cycle de *Haemonchus contortus* chez le mouton.**

L'infestation de la muqueuse par les larves induit une très forte réaction immunitaire locale.

De plus, la spoliation sanguine par les larves et adultes hématophages peut avoir des répercussions sur l'état général de l'animal : l'anémie qui apparaît lors d'infestation marquée est même utilisée comme moyen diagnostique [23].

### **I.2.2. Réponse immunitaire**

La réponse immunitaire contre *Haemonchus* est fortement orientée Th<sub>2</sub> [24]. Les lymphocytes T auxiliaires ou L<sub>T</sub> CD4<sup>+</sup> jouent un rôle important, et leur présence dans l'organisme est directement corrélée à la capacité de combattre l'infestation [25, 26]. La réponse immunitaire fait aussi intervenir la production d'anticorps par les lymphocytes B (IgE, IgA localement, IgG) [27]. Enfin, la réaction immunitaire induit une augmentation du nombre de mastocytes et de granulocytes éosinophiles.

La plupart des publications sur le sujet étudie les profils cellulaires dans le nœud lymphatique de drainage et la paroi muqueuse de la caillette.

Il apparaît que la réponse immédiate à l'infestation larvaire est caractérisée par l'activation des  $L_B$  et des  $L_T CD4^+$  dans le nœud lymphatique d'une part, et par le recrutement d'éosinophiles,  $L_T CD4^+$ ,  $L_T \gamma\delta$  et  $L_B$  dans la muqueuse d'autre part [28].

La réponse tardive, quant à elle, est caractérisée non seulement par une augmentation de la fraction de  $L_T CD4^+$  dont les  $CMH II^+$  et de cellules  $\gamma\delta^+$  dans le nœud lymphatique, mais aussi une augmentation des  $CD4^+ CD25^+$ , contrairement à ce qui a été noté au cours de la réponse précoce où leur proportion est peu modifiée [29]. Ces résultats ont été obtenus chez des individus hébergeant des larves dans la paroi muqueuse (aucune modification des effecteurs de la réponse immunitaire n'a été mise en évidence chez les individus n'hébergeant pas de larves).

La réponse immunitaire est entretenue par un pool de parasites dans la caillette. Les traitements anthelminthiques diminuent l'immunité des animaux [30].

### **I.3. Phénotypage des cellules**

L'étude que nous avons réalisée consiste à quantifier différentes populations de cellules sanguines qui sont impliquées dans la réponse immunitaire, à différents moments de l'infestation. Pour cela nous avons utilisé la cytométrie en flux. Le principe est de marquer les cellules grâce à un anticorps fluorescent qui se fixe à un antigène de surface spécifiquement exprimé par la population cellulaire que l'on veut détecter. Le FACS (Fluorescent Activated Cell Sorter) est alors utilisé pour séparer et énumérer les différentes populations préalablement marquées. L'analyse en 4 couleurs permet trier plus précisément les cellules en combinant différents anticorps sur la même analyse.

Les récepteurs de surface ou marqueurs cellulaires que nous avons utilisés sont détaillés dans le paragraphe II.5.3.2. : Anticorps utilisés.

### **I.4. Objectifs et intérêts de l'étude**

Notre étude fait suite à d'autres séries de mesures visant à mesurer l'impact de la sélection pour une résistance accrue aux mammites sur d'autres caractères des animaux.

Il s'agit ici d'étudier les paramètres de la réponse immunitaire lors d'une infestation par *Haemonchus* et de voir s'il existe une différence entre les lignées CCS. On sait déjà que les deux lignées ont des degrés de résistance aux mammites différents. La question est de savoir si la différence de résistance à l'infection bactérienne de la mamelle va de pair avec une différence de réponse immunitaire vis-à-vis d'un parasite, en l'occurrence *Haemonchus contortus*.

Le premier intérêt de cette étude est de savoir si les capacités de réaction des deux lignées diffèrent face à une infection différente de celle contre laquelle les animaux ont été sélectionnés.

Plus globalement il s'agit de déterminer si la sélection des brebis sur les CCS induit une sélection sur un paramètre *a priori* complètement différent, ici la résistance au parasite digestif *Haemonchus contortus*. En effet il est important lorsqu'on veut sélectionner sur un critère, de savoir si la sélection sur ce critère ne détériore pas d'autres caractères.

Cette étude a permis d'évaluer l'impact de la sélection sur les CCS sur un autre caractère d'importance en élevage.

Le second intérêt de cette étude est de tenter d'affiner les connaissances sur les mécanismes immunitaires intervenant dans la réponse face à une infestation parasitaire. En effet on sait que les animaux des deux groupes ont une réponse plus ou moins efficace face à une infection bactérienne de la mamelle, mais les modalités de cette réponse restent floues. En comparant les réponses immunitaires des deux groupes dans un contexte différent, c'est-à-dire une infestation parasitaire, cette étude peut permettre d'identifier le compartiment cellulaire ou le volet de la réponse immunitaire qui a été modifié par la sélection, et donc identifier les effecteurs qu'elle affecte. Ainsi il serait possible de créer un parallèle avec la réponse antibactérienne et de pointer du doigt les effecteurs modifiés par la sélection génétique.

Rapport-Genetix.com

## II. MATERIEL ET METHODES

### II.1. Animaux

53 moutons mâles âgés de 3 mois ont été utilisés dans cette expérience. Ces moutons de race Lacaune sont la première génération issue d'une sélection basée sur le comptage de cellules somatiques (CCS) dans le lait (cf. supra, Figure 1). Ils sont donc composés de deux groupes : le groupe « CCS- » (résistants aux mammites) contient 26 individus et le groupe « CCS+ » (sensibles) contient 27 individus.

Les animaux ont été élevés en bergerie depuis la naissance ; ils n'ont donc jamais été infestés par *Haemonchus*.

Filiation entre les animaux :

Huit pères sont à l'origine des 53 agneaux. Quatre appartiennent au groupe « résistant » et quatre au groupe « sensible ». Le nombre de fils issus de chaque père est variable, comme indiqué dans le Tableau 1.

**Tableau 1** : Ascendance des moutons utilisés dans l'expérimentation.

Groupe	Père	Nombre de fils
CCS+	10502	9
	10544	5
	11110	5
	10508	8
CCS-	215	10
	743	1
	20504	12
	990546	3
Total	8	53

Les moutons ont été répartis de façon aléatoire en trois lots afin d'étaler les prélèvements sur trois jours. Ils ont été logés dans un local fermé et nourris avec du concentré et du foin, *ad libitum* ; l'eau était disponible dans des abreuvoirs automatiques.

Préalablement à l'expérience, les moutons ont reçu une administration orale d'Ivermectine (Oramec®) à la dose de 0.2 mg/kg, et de Diclazuril (Vecoxan®) à la dose de 1 mg/kg, pour éliminer les infestations parasitaires pré-existantes.



### II.3. Prélèvements

Les principales séries de prélèvement sont résumées dans le Tableau 2.

**Tableau 2 : Planning des différentes interventions et prélèvements.**

	Jour	Coprologie	N/F	Hémato	Ficoll et FACS	Pepsinogène	ELISA Ac	Analyses sur NL
1ère infestation	J0							
	J7							
	J14							
	J21							
	J24							
	J27							
	J30							
	J35							
2ème infestation	J50							
	J57							
	J64							
	J67							
	J72							
	J76							
	J79							
	J84							
3ème infestation	J152							
	J159							
	J166							
	J173							
	J176							
	J180							
	J187							
	J190							
	J194							
	J197							
	J201							
	J203							
	J208							

### **II.3.1. Dénombrement des œufs de *Haemonchus***

La recherche des œufs a été réalisée en suivant la méthode de Mac Master (Annexe 1), avec 3 grammes de fèces. Les résultats ont été comptabilisés en œuf par gramme (OPG).

### **II.3.2. Sang**

Les prélèvements de sang ont été réalisés à la veine jugulaire à l'aide de tubes Vacutainer® de 5 ml.

### **II.4. Numération et formule sanguine**

Les prélèvements ont été réalisés sur tube EDTA.

La numération et la formule sanguine ont été faites soit manuellement au microscope, soit à l'aide d'un automate d'hématologie (Melet-Schloesing, Paris, France).

### **II.5. Phénotypage par cytométrie de flux**

Les prélèvements ont été réalisés sur tubes citrate.

#### **II.5.1. Purification des cellules mononucléées**

L'extraction des cellules mononucléées du sang est réalisée selon la méthode d'extraction par gradient de Ficoll (Annexe 2). Les cellules sont séparées en fonction de la densité cellulaire qui dépend de la taille des cellules ainsi que de leur masse.

#### **II.5.2. Numération des cellules**

50 µl de suspension cellulaire préalablement homogénéisée ont été mélangés dans 10 ml de solution PBS/EDTA, puis les cellules ont été énumérées à l'aide d'un compteur de particules double seuil {8 ;20 µm} (Z2, COULTER).

Le compteur automatique a pris en compte les cellules dont la taille est située entre 8 et 20 µm, et a donné leur concentration en millions par millilitre.

## **II.5.3. Immunomarquage des cellules et analyse FACS**

### **II.5.3.1. Marquage des cellules**

Cf. Annexe 3 pour le protocole de marquage des cellules.

### **II.5.3.2. Anticorps utilisés**

Cf. Annexe 4 pour les caractéristiques techniques des anticorps utilisés.

- Iodure de Propidium :

Un marquage à l'iodure de propidium permet de différencier les cellules vivantes et les cellules mortes, afin de ne prendre en compte au moment de l'analyse et des calculs, que les cellules vivantes.

- Marquages CD2, CD4 et CD8 :

Le CD2 est le marqueur des lymphocytes T ;

Le CD4 est un co-récepteur des lymphocytes T auxiliaires qui participe à la reconnaissance du CMH II.

Le CD8 est un co-récepteur des lymphocytes T cytotoxiques servant à l'adhésion au CMH I.

- Marquage CD44 :

L'expression du marqueur CD44 permet de mesurer la fréquence des L<sub>T</sub> mémoires. En effet les lymphocytes T mémoires et les lymphocytes T activés surexpriment le CD44.

Ce marquage est couplé au marquage CD4/CD2 qui permet de repérer les lymphocytes T CD4<sup>+</sup>.

- Marquages CMH II et CD14 :

Les cellules exprimant le CD14 sont les monocytes.

Les cellules exprimant le CMH II sont des cellules présentatrices d'antigènes, principalement des lymphocytes B et des lymphocytes T activés.

Les cellules exprimant le CMH II mais pas le CD14 sont majoritairement des lymphocytes B.

- Marquage CD25 :

Les cellules exprimant le CD25 sont des L<sub>T</sub> récemment activés ou dits régulateurs.

- Marquage WC1 :

L'antigène WC1 reconnaît le récepteur des  $L_T \gamma\delta$  qui par définition sont « non restreints au CMH », ils peuvent reconnaître directement certains antigènes sans présentation via le CMH.

- Marquages CD5 et CD21 :

Le CD5 est un marqueur d'une population de lymphocytes B et lymphocytes T sur lesquels il est plus faiblement exprimé.

Le CD21 est un marqueur d'une fraction des lymphocytes B.

## **II.6. Prélèvements nécropsiques**

### **II.6.1. Déroulement des autopsies**

A J34 de la seconde infestation, 20 moutons ont été euthanasiés. Le choix des agneaux a été fait selon les résultats des excrétions d'œufs à J29. Pour chaque groupe CCS+ et CCS-, 10 moutons ont été choisis afin de représenter tous les stades d'excrétion (excréteur faible, médian, et fort).

Les agneaux ont été isolés et mis à jeun la veille.

Après euthanasie par injection intraveineuse de Doléthal®, les agneaux ont été immédiatement saignés, puis la caillette a été prélevée ainsi que le nœud lymphatique abomasal ; pour certains animaux le nœud lymphatique cervical superficiel a également été prélevé.

Le nœud lymphatique abomasal a été pesé puis deux aliquotes ont été découpées : une moitié a été utilisée pour l'analyse en cytométrie, l'autre congelée pour conservation et analyse immuno-histologique.

A J56 de la troisième infestation, soit 208 jours après le début de l'expérience, le reste des moutons a été euthanasié, soit 33 animaux. Les mêmes prélèvements que précédemment ont été effectués.

### **II.6.2. Isolement des cellules des nœuds lymphatiques, marquage et analyse en cytométrie**

Un petit morceau de nœud lymphatique a été prélevé et broyé sur un filtre, afin de mettre les cellules en suspension dans du RPMI (milieu de Moore).

La concentration en cellules a été déterminée à l'aide du compteur, puis la concentration a été uniformisée entre tous les échantillons à  $6.10^6$  cellules/ml. Le marquage FACS a été réalisé en suivant sur x cellules.

### **II.6.3. Récupération et analyse du contenu abomasal**

Le contenu de la caillette a été vidé dans un récipient, la paroi de la caillette rincée, puis les vers récoltés. Les vers ont ensuite été dénombrés par catégorie : adultes males/femelles, immatures. Les vers femelles ont été mesurés.

## **II.7. Autres analyses**

### **II.7.1. Hématocrite**

Deux séries de données ont été réalisées, une manuellement et l'autre à l'aide d'un analyseur d'hématologie (MELET SCHLOESING, MS9.5).

Le taux d'hématocrite manuel est déterminé après centrifugation, sur micro-tubes et mesure à l'aide d'un abaque.

### **II.7.2. Pepsinogène**

Le dosage du pepsinogène est réalisé à partir du sérum par la méthode décrite par Dorny et Vercruysse, détaillée dans l'Annexe 5.

### **II.7.3. Tests ELISA**

Les taux d'anticorps dirigés contre les antigènes issus des produits d'excrétion-sécrétion du parasite adulte, et contre les antigènes de larves L3 sont mesurés à l'aide de techniques ELISA (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay). Cf. Annexe 6 pour la description de la technique.

La méthode retenue pour déterminer le titre en anticorps est la suivante :  
On part d'un standard dont le titre en anticorps est connu. On réalise plusieurs dilutions au tiers (1000, 300, 100, 30, 10, 3, 1), et cette gamme sert de référence pour l'ELISA. Un standard est ainsi établi par la correspondance entre la densité optique obtenue et chaque dilution du standard.

Le titre de chaque échantillon a été exprimé en unités arbitraires, grâce aux densités optiques des différentes dilutions. On obtient alors un graphique donnant le titre en fonction de la densité optique : c'est la courbe du standard.

Les échantillons à tester sont dilués et testés en ELISA. Puis on mesure leur densité optique. On utilise ensuite la courbe du standard dans sa partie linéaire pour exprimer chaque mesure de densité optique par un titre. On corrige le facteur de dilution appliqué à l'échantillon, et on obtient le titre en anticorps défini en unités arbitraires.

### III. RESULTATS

#### III.1. Excrétion d'œufs au cours des réponses primaire et mémoire

##### III.1.1. Réponse primaire

Les deux premières infestations ont été réalisées par administration orale de 10 000 larves L3 de *Haemonchus contortus*. En fin de première infestation, soit à J35, les moutons ont reçu un traitement anthelminthique par voie orale.

La courbe d'excrétion d'œufs dans les fèces (Graphique 1) était d'aspect classique avec un début d'excrétion vers J21 puis une augmentation progressive jusqu'à un palier.

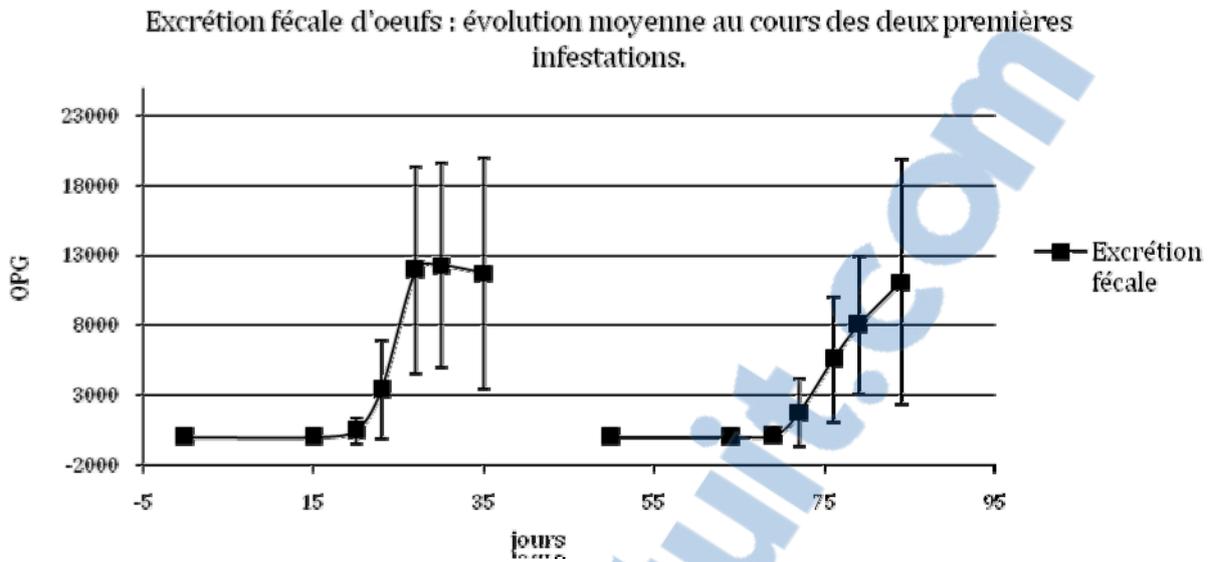
L'excrétion fécale était nulle jusqu'à J20, date à laquelle certains individus ont commencé à excréter des œufs, d'abord faiblement, puis en plus grande quantité. Le niveau d'excrétion a augmenté jusqu'à atteindre en moyenne 12 000 œufs par gramme de fèces à J30.

A J35, la quantité d'œufs excrétés était toujours très élevée et paraissait stable.

Quinze jours après vermifugation, l'absence d'œufs a été vérifiée. Aucun œuf de *Haemonchus contortus* n'a été détecté ce qui confirme l'efficacité du traitement anthelminthique réalisé.

L'excrétion fécale a de nouveau été positive 22 jours après la seconde infestation. Le niveau d'excrétion a augmenté jusqu'au dernier jour de la seconde infestation, J34, sans qu'un palier semble avoir été atteint. La valeur de l'excrétion était alors de 11 000 œufs par gramme en moyenne sur les deux groupes, valeur comparable à celle obtenue lors de la première infestation.

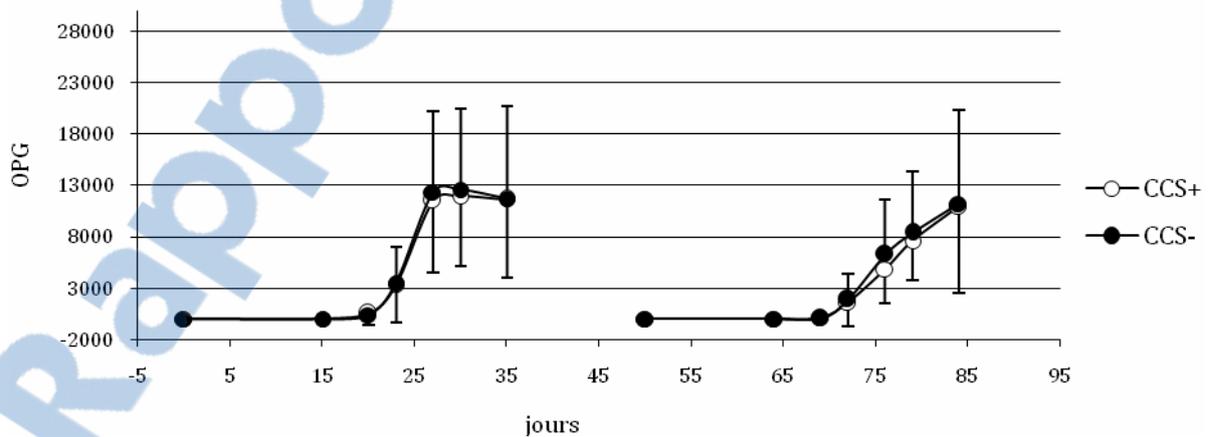
*Remarque* : Les valeurs moyennes sont cependant à nuancer car il y avait une très forte variabilité interindividuelle, responsable d'écarts types très grands. Par exemple en début d'excrétion certains individus excrétaient beaucoup alors que d'autres n'excrétaient pas, ce que ne traduit pas la valeur moyenne.



**Graphique 1** : Evolution du nombre d'œufs excrétés par gramme de fèces lors des deux premières infestations : valeurs moyennes sur les deux groupes.

En comparant les moyennes des deux groupes (Graphique 2), il n'y avait pas de différence significative de niveau d'excrétion. Il fallait cependant noter une tendance du groupe CCS- à excréter un peu plus en moyenne.

Excrétion fécale d'œufs : comparaison des deux groupes au cours des deux premières infestations.



**Graphique 2** : Evolution du nombre d'œufs excrétés par gramme de fèces lors des deux premières infestations : comparaison des groupes CCS+ et CCS-.

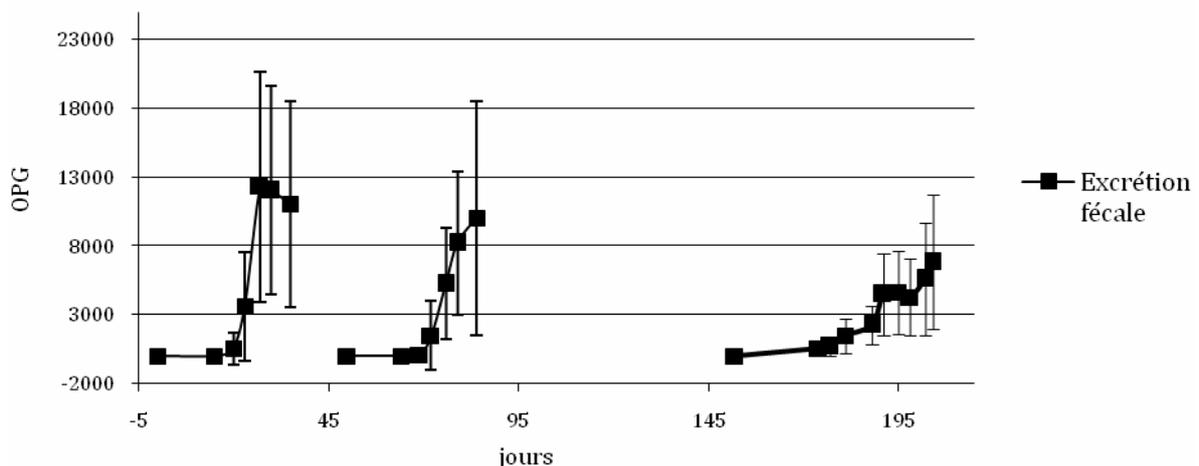
### III.1.2. Réponses secondaire et mémoire

La troisième infestation a eu lieu 2 mois après la fin de la seconde infestation et le traitement des animaux avec un antihelminthique. Ce délai était nécessaire pour que la réponse immunitaire vis-à-vis de *Haemonchus* diminue.

Le protocole d'infestation a été différent : trois inoculations de larves par voie orale ont été réalisées à 7 jours d'intervalle, respectivement 3 000, 3 000 et 4 000 larves L3 à J0, J7 et J14 ; soit un total de 10 000 larves.

L'excrétion a débuté dès la première mesure à J21. Le niveau d'excrétion moyen a augmenté par paliers (J21, J28 puis J38), correspondant probablement à 3 vagues de développement parasitaire, elles-mêmes liées aux trois infestations successives (Graphique 3).

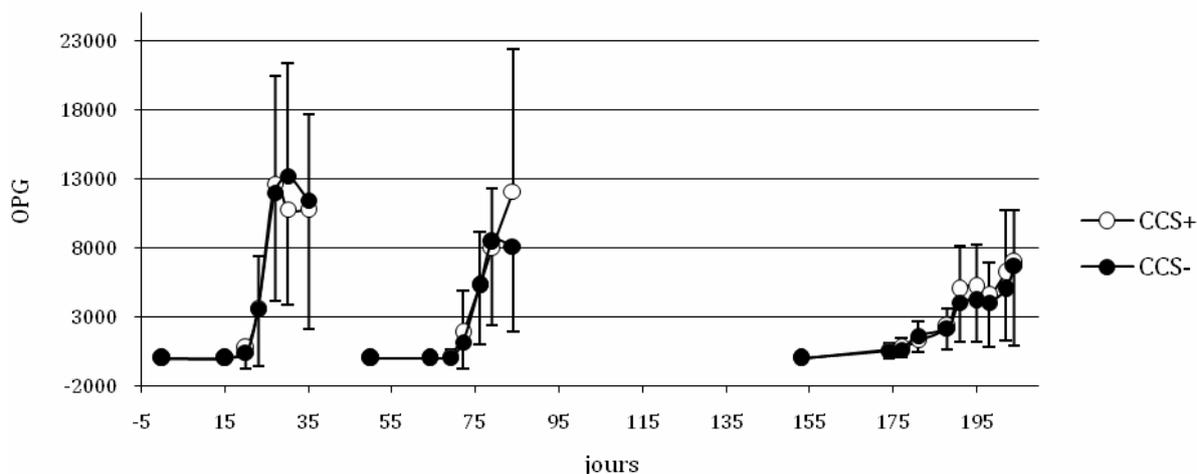
Excrétion fécale d'œufs : évolution moyenne au cours des trois infestations.



**Graphique 3** : Evolution du nombre d'œufs excrétés par gramme de fèces lors des trois infestations : évolution moyenne sur les deux groupes.

Les deux groupes se sont comportés de la même manière en début d'excrétion, avec des valeurs moyennes très proches et toujours une très forte variabilité interindividuelle (écarts types élevés). Cependant à J38, début du plateau d'excrétion, est apparue une tendance du groupe CCS+ à avoir un niveau d'excrétion supérieur, du moins jusqu'à la fin de l'infestation où les deux groupes présentaient des valeurs moyennes similaires (Graphique 4).

Excrétion fécale d'œufs : comparaison des deux groupes au cours des trois infestations.



**Graphique 4** : Evolution du nombre d'œufs excrétés par gramme de fèces lors des trois infestations : comparaison des groupes CCS+ et CCS-.

## III.2. Variation des populations cellulaires sanguines

La numération et la formule sanguine ont été réalisées manuellement pour les deux infestations de la réponse primaire. Pour la troisième infestation, qui correspond à une phase mémoire de la réponse contre *Haemonchus contortus*, seule la formule a été réalisée manuellement ; la numération a été faite à l'aide d'un analyseur d'hématologie.

### III.2.1. Leucocytes totaux

En première infestation, la concentration sanguine en leucocytes a diminué et a atteint un minimum à J14, puis elle a remonté et s'est stabilisée jusqu'à J35.

En seconde infestation, la concentration en leucocytes a augmenté jusqu'à atteindre un pic à J14 puis a diminué progressivement.

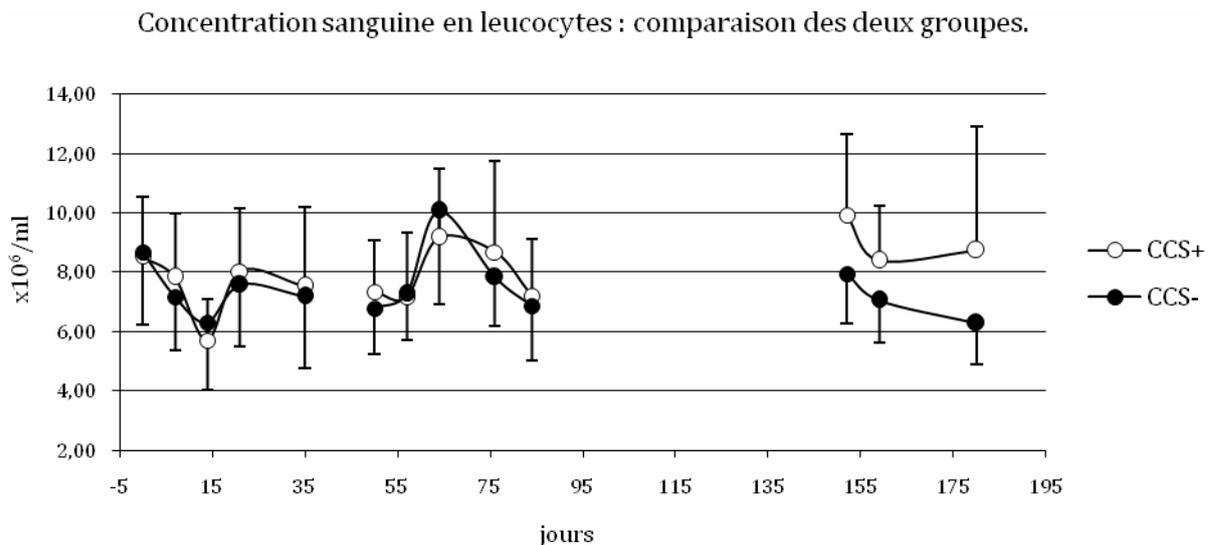
Le nombre de leucocytes dans le sang des animaux a donc évolué différemment entre la première et la deuxième infestation.

Aucune différence n'a été constatée entre les deux groupes d'animaux lors des deux premières infestations (Graphique 5).

En troisième infestation, les animaux ont présenté entre J0 et J7 une diminution de la quantité de globules blancs, puis cette valeur s'est stabilisée.

Les deux groupes présentaient des concentrations sanguines en leucocytes relativement différentes à chacun des trois points de prélèvements de la troisième infestation. Le groupe CCS+ présentait à chaque fois des concentrations plus élevées :  $9,9 \cdot 10^6/\text{ml}$  contre  $7,9 \cdot 10^6/\text{ml}$  à J0 (Student,  $p=0,01$ ),  $8,4 \cdot 10^6/\text{ml}$  contre  $7,1 \cdot 10^6/\text{ml}$  à J7 (Student,  $p=0,02$ ) et  $8,8 \cdot 10^6/\text{ml}$  contre  $6,3 \cdot 10^6/\text{ml}$  à J28 (Student,  $p=0,02$ ).

Pour les trois infestations, les concentrations moyennes mesurées étaient du même ordre de grandeur, autour de  $8 \cdot 10^6/\text{ml}$ .



**Graphique 5** : Evolution de la concentration sanguine en leucocytes au cours des trois infestations : comparaison des groupes CCS+ et CCS-.

### III.2.2. Principales populations cellulaires sanguines

#### III.2.2.1. Polynucléaires neutrophiles

La concentration en polynucléaires neutrophiles a diminué au cours de chacune des infestations. Elle avait une valeur plus élevée au début de chaque nouvelle infestation qu'à la fin de l'infestation précédente.

Les valeurs ont évolué selon la même tendance dans les deux groupes ; cependant des différences ont été observées.

Le groupe CCS+ présentait régulièrement des valeurs plus élevées en neutrophiles, en particulier :

- En première infestation, avec une valeur moyenne de  $2,9 \cdot 10^6$ /ml contre  $2,3 \cdot 10^6$  à J7 (Student,  $p=0,03$ ),
- En troisième infestation avec des valeurs de  $3,3 \cdot 10^6$ /ml contre  $2,4 \cdot 10^6$  à J7 (Student,  $p=0,01$ ) et de  $2,9 \cdot 10^6$ /ml contre  $1,9 \cdot 10^6$  à J28 (Student,  $p=0,02$ ).

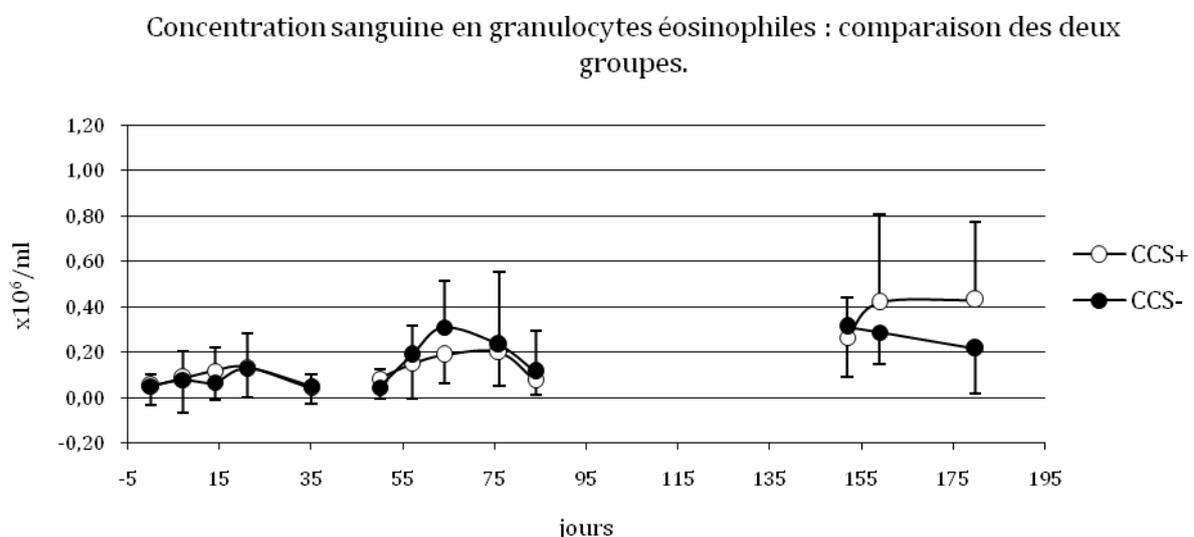
### III.2.2.2. Polynucléaires éosinophiles

En première infestation, la quantité d'éosinophiles dans le sang a doublé entre J0 et J7, avant de se stabiliser autour de  $1,2 \cdot 10^5$ /ml (Graphique 6). Enfin, elle a diminué entre J21 et J35, date à laquelle la quantité d'éosinophiles est semblable à celle à J0, soit  $0,5 \cdot 10^5$  éosinophiles par ml de sang.

En seconde infestation, les mêmes événements qu'en première infestation se produisent, mais en plus accentués ; les valeurs moyennes passant de  $0,6 \cdot 10^5$ /ml à J0 à  $2,7 \cdot 10^5$ /ml à J14. Puis les valeurs diminuent, atteignant  $1 \cdot 10^5$ /ml à J34.

En troisième infestation les valeurs étaient plus élevées que lors des infestations précédentes, avec  $2,9 \cdot 10^5$ /ml en moyenne à J0. Les valeurs sont restées élevées pendant toute la durée des prélèvements.

Les valeurs des deux groupes étaient proches à J0, mais à J28 le groupe CCS+ présentait une concentration en éosinophiles circulants beaucoup plus élevée que celle du groupe CCS- :  $4,3 \cdot 10^5$ /ml contre  $1,9 \cdot 10^5$ /ml (Student,  $p=0,02$ ).



**Graphique 6 : Evolution de la concentration sanguine en granulocytes éosinophiles au cours des trois infestations : comparaison des groupes CCS+ et CCS-.**

### III.2.2.3. Polynucléaires basophiles

Les concentrations en polynucléaires basophiles ont peu évolué, et aucune différence n'a été remarquée entre les groupes.

### III.2.2.4. Lymphocytes

En première infestation, la quantité de lymphocytes circulants est restée stable lors des deux premières mesures puis a fortement diminué à J14, date à laquelle la concentration était de  $3,2 \cdot 10^6/\text{ml}$  en moyenne. Ensuite une lymphocytose est apparue, les valeurs à J21 dépassant celles à J0. Enfin, la concentration en lymphocytes a diminué jusqu'en fin de première infestation où la valeur était de  $4,4 \cdot 10^6/\text{ml}$ .

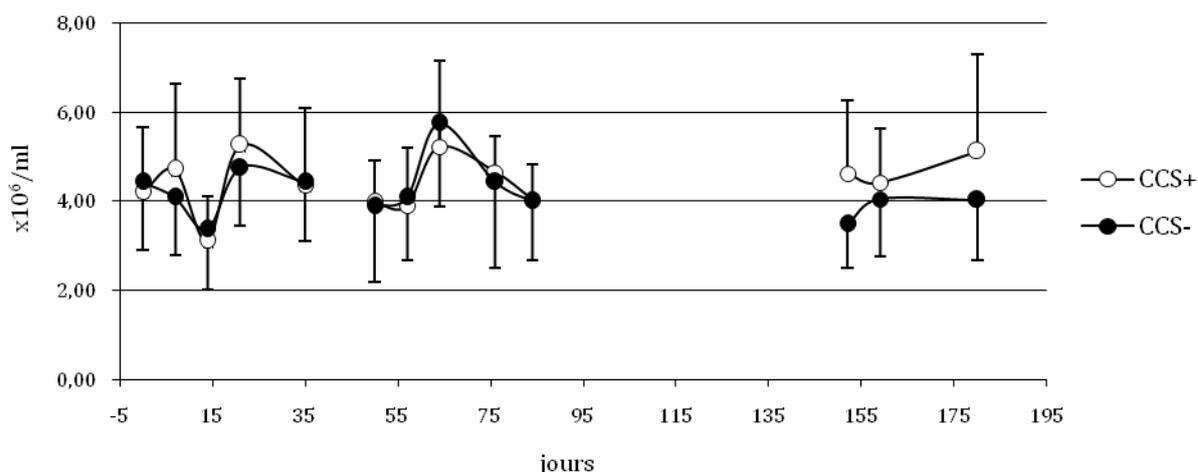
En seconde infestation, les valeurs étaient stables au début mais très vite la concentration en lymphocytes a fortement augmenté : elle était maximale à J14 avec une moyenne de  $5,5 \cdot 10^6/\text{ml}$ . Les valeurs ont ensuite diminué régulièrement jusqu'au jour du traitement où la moyenne était de  $4,0 \cdot 10^6/\text{ml}$ .

Les deux groupes présentaient une évolution similaire de la concentration en lymphocytes circulants lors des deux premières infestations (Graphique 7).

En troisième infestation les valeurs des deux groupes ont divergé : les valeurs du groupe CCS+ étaient supérieures à celles du groupe CCS- durant toute l'infestation, avec à J0 une concentration moyenne de  $4,6 \cdot 10^6/\text{ml}$  contre  $3,5 \cdot 10^6/\text{ml}$  (Student,  $p=0,01$ ).

La concentration en lymphocytes du groupe CCS+ a diminué ensuite légèrement 7 jours après l'infestation, avant de remonter en fin d'infestation. Le groupe CCS-, lui, avait une valeur à J0 moins importante mais qui a augmenté entre J0 et J7, avant de se stabiliser.

Concentration sanguine en lymphocytes : comparaison des deux groupes.



**Graphique 7** : Evolution de la concentration sanguine en lymphocytes au cours des trois infestations : comparaison des groupes CCS+ et CCS-.

### III.2.2.5. Monocytes

La concentration en monocytes circulants a diminué au cours de chaque infestation.

Il n'y avait pas de différence significative entre les groupes.

## III.3. Immunophénotypage

### III.3.1. Numération des cellules

Le comptage intervient après extraction des cellules mononucléées (ou PBMC pour Peripheral Blood Mononuclear Cells) à l'aide d'un gradient de Ficoll.

#### III.3.1.1. Réponse primaire

Lors de la première infestation, le nombre de PBMC récupérés était très légèrement modifié, avec une tendance à la baisse entre J0 et J35 (Graphique 7). La moyenne sur les deux groupes était de  $1,1 \cdot 10^7$  cellules dans 5 ml de sang à J0.

L'évolution des valeurs dans les deux groupes a été comparable lors de la première infestation, et les valeurs moyennes étaient très proches.

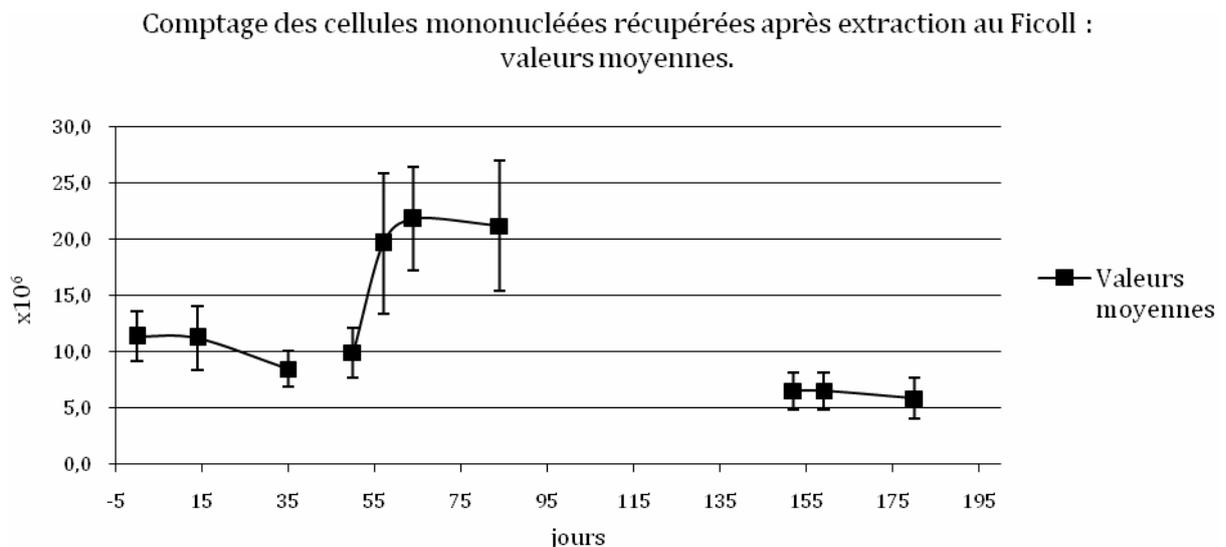
En revanche, dès le début de la seconde infestation nous avons observé une très forte augmentation du nombre de PBMC à partir du sang circulant ; les valeurs moyennes passant de  $10^7$  cellules dans 5 ml de sang à J0, à  $2,1 \cdot 10^7$  cellules à J14. Puis les valeurs se sont stabilisées, la valeur moyenne atteignant  $2,3 \cdot 10^7$  cellules dans 5 ml de sang à la fin de l'infestation.

En seconde infestation, à partir de J14, le groupe CCS+ a montré nombre légèrement supérieur de PBMC. Cette tendance était marquée à J34 avec un écart plus grand entre les deux groupes, toutefois cet écart n'était pas significatif :  $2,6 \cdot 10^7$  cellules dans 5 ml de sang pour le groupe CCS+ contre  $2,0 \cdot 10^7$  cellules pour le groupe CCS- (Student,  $p=0,07$ ) (Graphique 8).

### III.3.1.2. Réponse mémoire

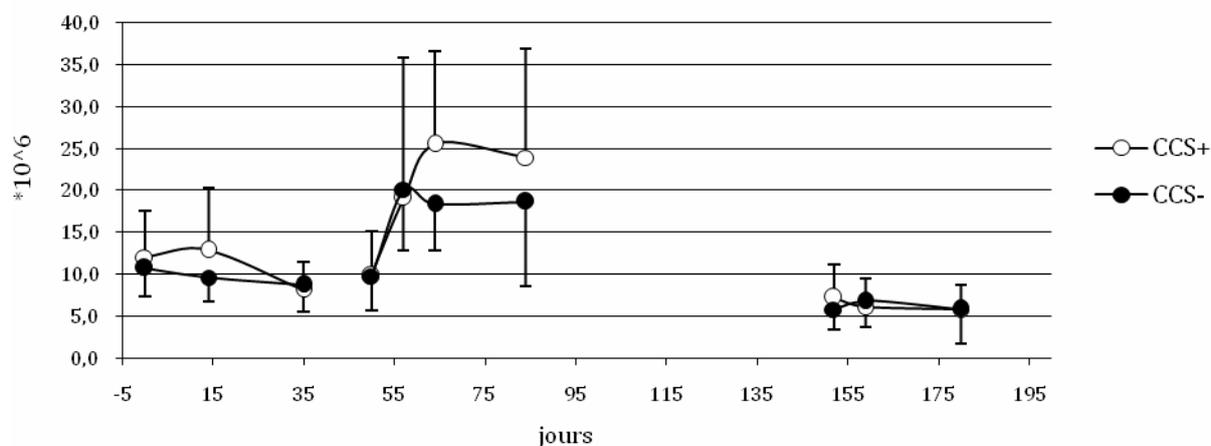
Les concentrations en PBMC dans le sang étaient basses lors de la troisième infestation (Graphique 8).

Les deux groupes présentaient des valeurs similaires (Graphique 9).



**Graphique 8 : Evolution moyenne du nombre de cellules mononucléées récupérées après extraction au Ficoll au cours des trois infestations.**

Comptage des cellules mononucléées récupérées après extraction au Ficoll :  
comparaison des groupes.



**Graphique 9** : Evolution du nombre de cellules mononucléées récupérées après extraction au Ficoll au cours des trois infestations : comparaison entre le groupe CCS+ et le groupe CCS-.

### III.3.2. Proportion des sous-populations cellulaires analysées en cytométrie (résultats exprimés en %)

#### III.3.2.1. Pureté des PBMC

La pureté des PBMC est très bonne ; elle s'élève à 96 % environ à chaque point de prélèvement.

La viabilité telle que mesurée par cytométrie était faible car elle prend en compte tous les événements qui passent devant la cellule de comptage, or ces événements contenaient plusieurs autres populations cellulaires mortes auparavant tels que les érythrocytes. La viabilité en PBMC était en réalité supérieure aux valeurs avoisinant 70% qui ont été observées.

#### III.3.2.2. Lymphocytes T (CD2)

Le marquage des cellules avec un anticorps dirigé contre le CD2 permet d'identifier les lymphocytes T et les cellules NK ; ces dernières sont peu abondantes dans le sang.

En première infestation, la proportion de L<sub>T</sub> a augmenté : de 27% à J0 à 35,3% des cellules mononucléées à J35 pour le groupe CCS+. Les deux groupes avaient des valeurs moyennes très proches, même si celle du groupe CCS+ était légèrement supérieure (Graphique 10).

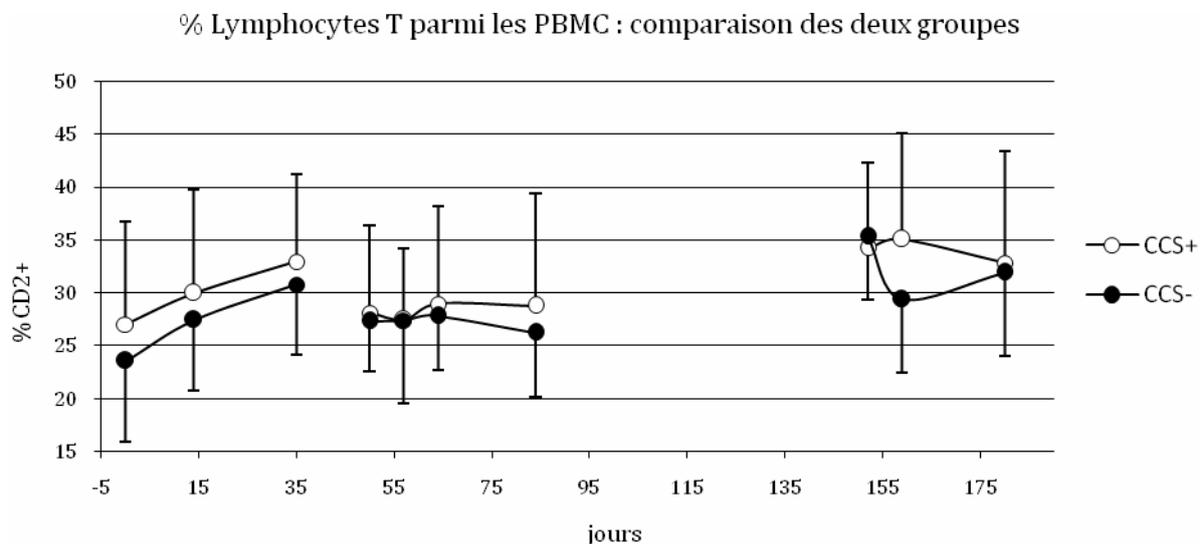
En début de seconde infestation le pourcentage de  $L_T$  était inférieur à celui mesuré en fin de première infestation : 27,5% contre 35,3% de moyenne au sein du groupe CCS+. La fraction de  $L_T$  a subi une très légère augmentation au long de la seconde infestation jusqu'à J14, avant de redescendre légèrement (27,5% en moyenne à J34). Les deux groupes présentaient des valeurs très proches.

Le groupe de 31 animaux s'est comporté de la même manière que le groupe de 53 animaux lors des deux premières infestations, ce qui indique que, sur ce critère au moins, il est représentatif de la totalité du groupe.

En début de troisième infestation le pourcentage de  $L_T$  était supérieur à celui mesuré en fin de seconde infestation : 34,8% contre 27,5% de moyenne. Globalement le pourcentage de  $L_T$  a diminué au cours de cette dernière infestation.

Les deux groupes ont présenté des différences : la valeur moyenne du groupe CCS+ est restée stable tandis que celle du groupe CCS- a diminué puis remonté. A J7 l'écart était important avec 35,0% pour les CCS+ contre 29,4% pour les CCS- (Student,  $p=0,04$ ).

En fin de troisième infestation la différence entre les groupes était moindre, et le groupe CCS+ présentait une valeur moyenne légèrement supérieure à celle du groupe CCS-, avec 33% de  $L_T$  contre 30,9%.



**Graphique 10** : Pourcentage de lymphocytes T (CD2+) parmi les cellules mononucléées au cours des trois infestations : comparaison entre le groupe CCS+ et le groupe CCS-.

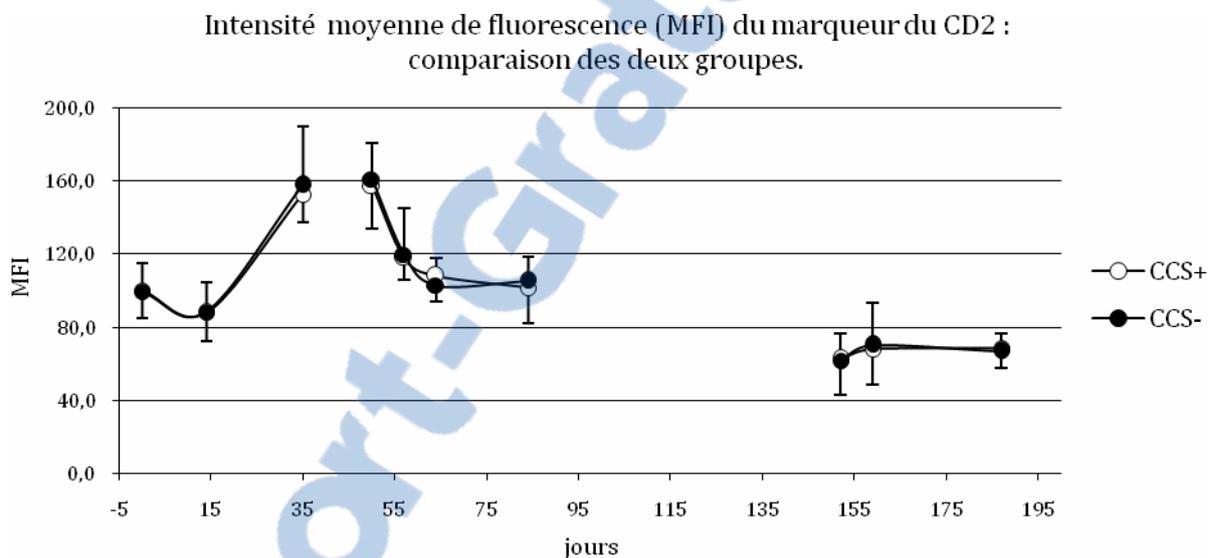
Mesure de l'intensité moyenne de fluorescence (MFI = Mean Fluorescence Intensity) :

Cette mesure permet de mesurer la densité d'expression du récepteur à la surface des cellules. Elle est une indication de l'état d'activation des cellules.

Pour le CD2, la MFI a suivi la même évolution pour les deux groupes (Graphique 11). En première infestation elle est descendue légèrement à J14 avant d'augmenter fortement : 153 à J35 contre 100 à J0.

En seconde infestation elle est fortement descendue, passant de 159 à J0 à 102 à J34.

En troisième infestation l'intensité moyenne de fluorescence du CD2 était en moyenne plus faible : 62,1 à J0. Elle est restée stable, et les deux groupes présentaient des valeurs similaires.



**Graphique 11** : Evolution de l'intensité moyenne de fluorescence du marqueur CD2 au cours des trois infestations : comparaison des groupes CCS+ et CCS-.

#### III.3.2.2.1. Les lymphocytes CD4

Le marquage des cellules avec un anticorps dirigé contre le CD4 permet, en couplant cette détection avec celle du CD2, de détecter les lymphocytes T auxiliaires.

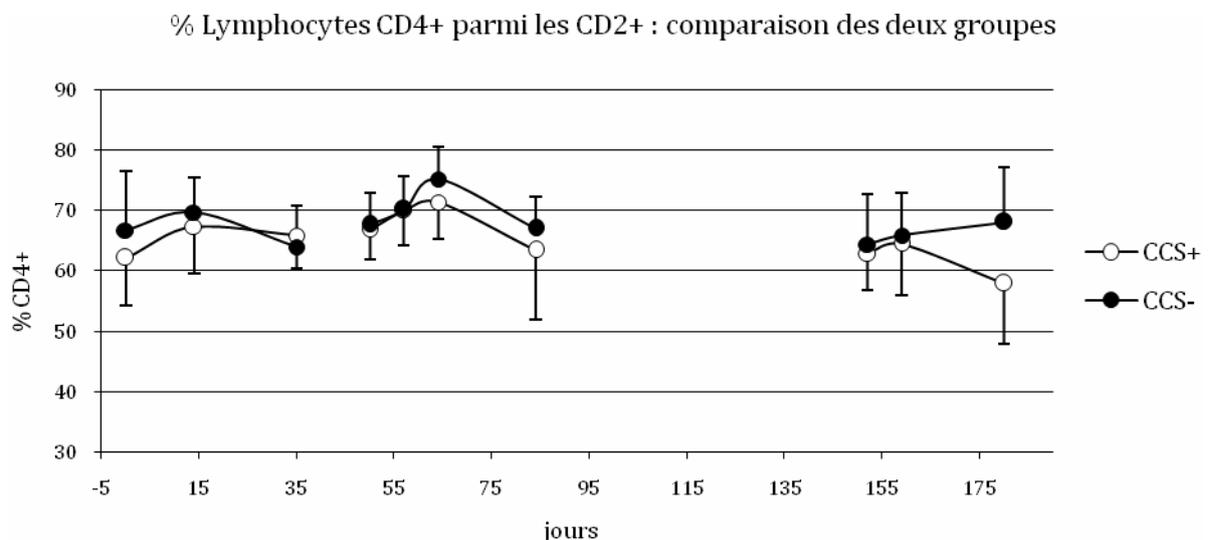
En première infestation, l'évolution globale était faible, avec une légère augmentation à J14.

Les deux groupes se sont comportés de façon identique.

En seconde infestation les valeurs moyennes du pourcentage de  $L_T CD4^+$  étaient un peu plus élevées : 67,7% à J0 contre 64,1% à J0 de la première infestation. Ces valeurs ont augmenté jusqu'à J14 avant de diminuer à J34 (Graphique 12).

Le groupe des animaux CCS- avait tendance à présenter une plus grande proportion de  $L_T CD4^+$ , avec à J14 de la seconde infestation une valeur moyenne de 74,3% contre 70,4 % pour le groupe des animaux CCS+ (Student,  $p < 0,01$ ).

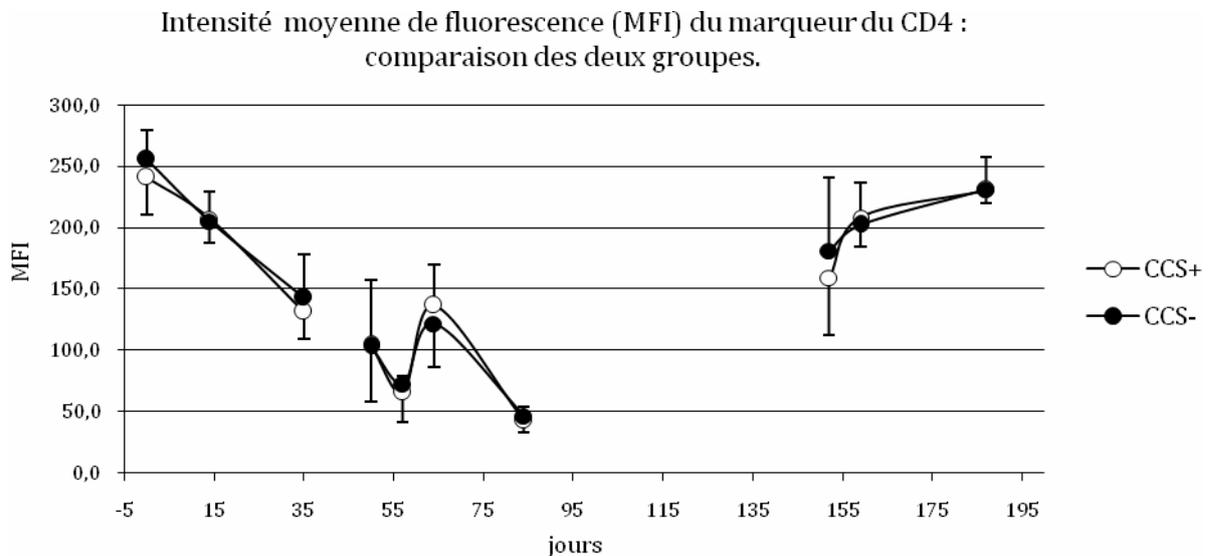
Lors de la troisième infestation, l'évolution globale dans les deux groupes était faible, les valeurs moyennes étaient autour de 65%. Cependant les deux groupes ont présenté des évolutions différentes : alors que les valeurs du groupe CCS- sont restées stables, celles du groupe CCS+ ont fortement diminué entre J14 et J28. A J28 la différence entre les deux groupes était très marquée, avec une valeur moyenne de 68,1% pour le groupe des animaux CCS- et 57,9% pour le groupe des animaux CCS+ (Student,  $p < 0,01$ ).



**Graphique 12 : Pourcentage de lymphocytes T CD4+ parmi les lymphocytes T au cours des trois infestations : comparaison entre le groupe CCS+ et le groupe CCS-.**

En première infestation, l'intensité moyenne de fluorescence du CD4 a très fortement diminué, passant d'une moyenne de 248 à J0 à 130 à J35 (Graphique 13). En seconde infestation elle a continué de diminuer jusqu'à une valeur de 68 à J7, puis est remontée à J14 avant de redescendre jusqu'à un minimum de 43 à J34. En troisième infestation l'intensité de fluorescence du CD4 avait des valeurs proches de celles rencontrées en première infestation. Elle a augmenté au cours de l'infestation.

Les valeurs des deux groupes étaient semblables pour chacune des trois infestations.



**Graphique 13** : Evolution de l'intensité moyenne de fluorescence du marqueur CD4 au cours des trois infestations : comparaison des groupes CCS+ et CCS-.

### III.3.2.2.2. Les lymphocytes CD8

Le marquage des cellules avec un anticorps dirigé contre le CD8 permet de détecter la population des lymphocytes T cytotoxiques.

Au cours de la première infestation, les valeurs moyennes ont légèrement diminué. Les deux groupes ne présentaient pas de différence (Graphique 14).

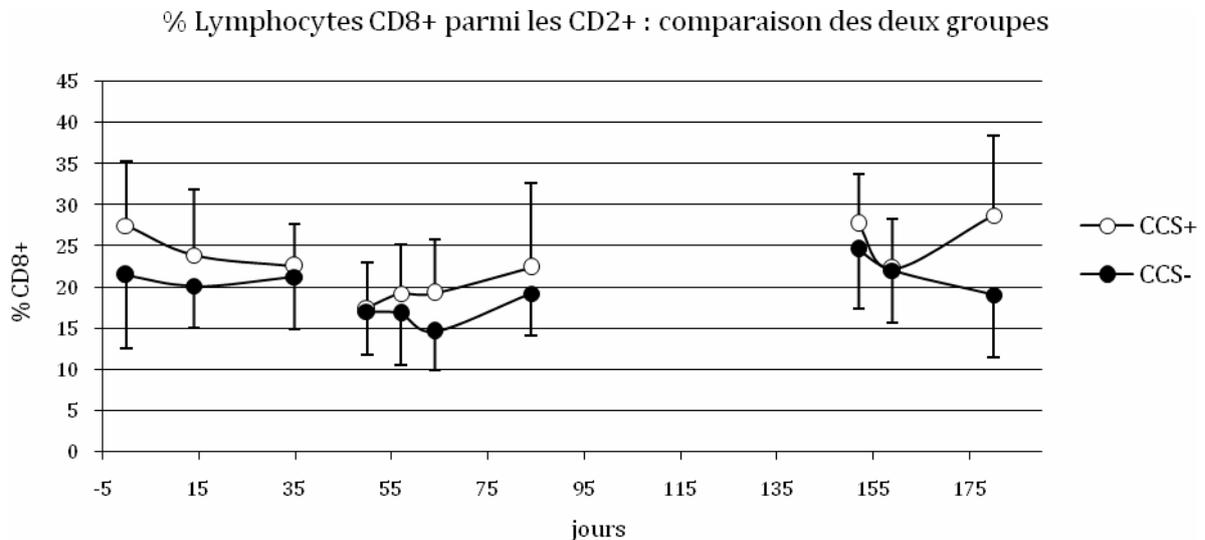
En début de seconde infestation les valeurs étaient plus faibles : 17,1% en moyenne à J0 contre 23,3% à J35 de la première infestation. Ces valeurs ont ensuite globalement augmenté. Les deux groupes ont présenté des différences : la valeur moyenne du groupe des animaux CCS- est restée en dessous de celle du groupe des animaux CCS+ dès J7.

A J14 le groupe CCS+ avait une valeur moyenne de 20% tandis que le groupe CCS- avait une valeur moyenne de 15,6% (Student,  $p < 0,01$ ).

En début de troisième infestation le pourcentage de  $L_T CD8^+$  était plus élevé qu'au dernier jour de l'infestation précédente, avec une moyenne de 26,1% à J0 contre 20,8% à J34 de la seconde infestation.

Les deux groupes ont présenté une diminution du pourcentage de  $L_T CD8^+$  entre J0 et J7, puis les évolutions ont été différentes : les valeurs du groupe CCS- ont

continué à diminuer tandis que les valeurs du groupe CCS+ ont fortement augmenté. A J28 la différence entre les groupes était significative, avec une valeur moyenne de 28,7% pour le groupe CCS+ contre 19,1% pour le groupe CCS- (Student,  $p < 0,01$ ).



**Graphique 14** : Pourcentage de lymphocytes T CD8+ parmi les lymphocytes T au cours des trois infestations : comparaison entre le groupe CCS+ et le groupe CCS-.

### III.3.2.2.3. Rapport CD4/CD8

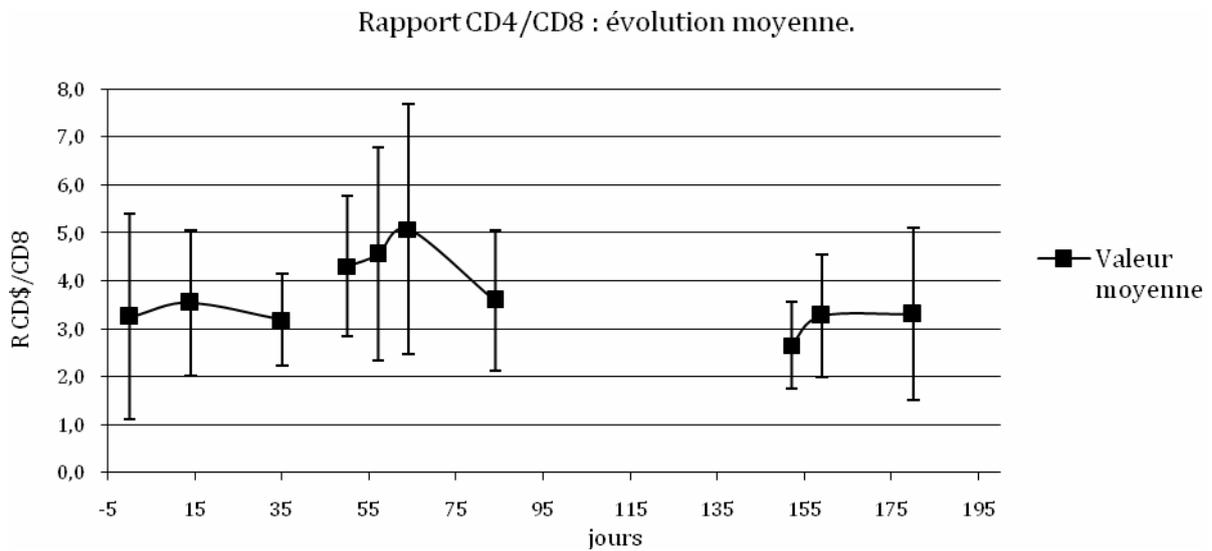
Le rapport CD4/CD8 était globalement stable en première infestation (Graphique 15). Les deux groupes présentaient des valeurs similaires (Graphique 16).

En seconde infestation le rapport CD4/CD8 a globalement diminué entre J0 et J34. Cependant si le groupe CCS+ a présenté une constante diminution, ce n'est pas le cas du groupe CCS- qui a présenté un pic à J14 avant une diminution à J34. A J14 les valeurs des deux groupes étaient très différentes : 5,5 pour le groupe CCS- contre 4,0 pour le groupe CCS+ (Student,  $p = 0,01$ ).

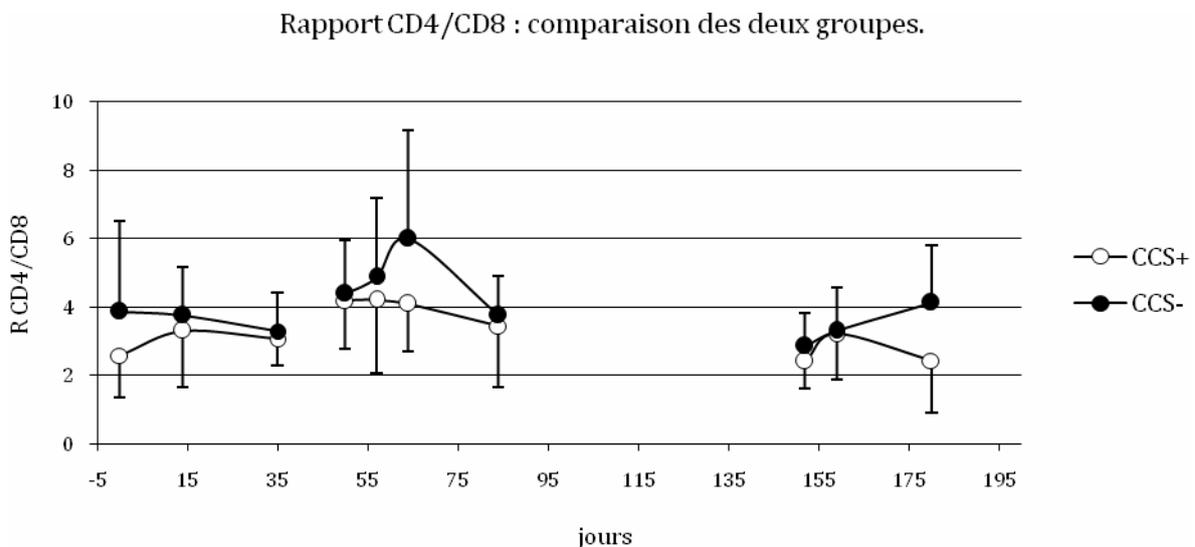
En troisième infestation, le rapport CD4/CD8 a légèrement augmenté à J7, avant de se stabiliser. Les deux groupes n'ont pas suivi la même évolution : le groupe CCS- a présenté une constante augmentation alors que le groupe CCS+ a plutôt présenté une diminution. En fin de troisième infestation la différence était notable avec 4,1 pour le groupe CCS- contre 2,4 pour le groupe CCS+ (Student,  $p < 0,01$ ).

La différence observée en milieu de seconde infestation est à nouveau présente en fin de troisième infestation.

Les valeurs des 31 animaux ayant participé à la troisième infestation sont, à J14 de la seconde infestation, de 4,1 pour les CCS+ et de 6,0 pour les CCS- (Student,  $p=0,02$ ). Ces valeurs sont comparables à celles obtenues pour la totalité du groupe ; cela prouve que les 31 animaux sont représentatifs du lot pour ces paramètres.



**Graphique 15** : Evolution moyenne du rapport CD4/CD8 au cours des trois infestations.



**Graphique 16** : Evolution du rapport CD4/CD8 au cours des trois infestations : comparaison des groupes CCS+ et CCS-.

#### III.3.2.2.4. Les lymphocytes $\gamma\delta$

Le marquage WC1 détecte une partie des lymphocytes  $\gamma\delta$ , qui sont des lymphocytes non restreints au CMH.

En seconde infestation, les valeurs moyennes sont restées stables entre J14 et J34, et ce pour les deux groupes : environ 29%.

Le groupe CCS+ a présenté un pourcentage de LT  $\gamma\delta$  légèrement plus élevé que le groupe CCS-, environ 3% de plus.

En troisième infestation, les valeurs moyennes ont peu évolué, elles sont restées entre 18 et 19%. Aucune différence n'était notable entre les deux groupes.

#### III.3.2.2.5. Les marqueurs d'activation des lymphocytes

- CD44

Le CD44 est un marqueur stable dans le temps et qui est exprimé par des L<sub>T</sub> CD4<sup>+</sup> mémoires ou activés, qui sont susceptibles de produire des cytokines.

L'expression du CD44 a été mesurée au cours de la seconde infestation, à J14 et J34.

La fraction des cellules surexprimant le CD44 était plus importante à J14 (valeur moyenne : 27,2%) qu'à J34 (valeur moyenne : 19,8%).

Le groupe CCS- a présenté une valeur moyenne supérieure à celle du groupe CCS+ à J14, avec 29,1% de L<sub>T</sub> CD44<sup>+</sup> contre 25,4% pour le groupe CCS+ (Student,  $p=0,05$ ). A J34 les valeurs des deux groupes étaient à nouveau très proches.

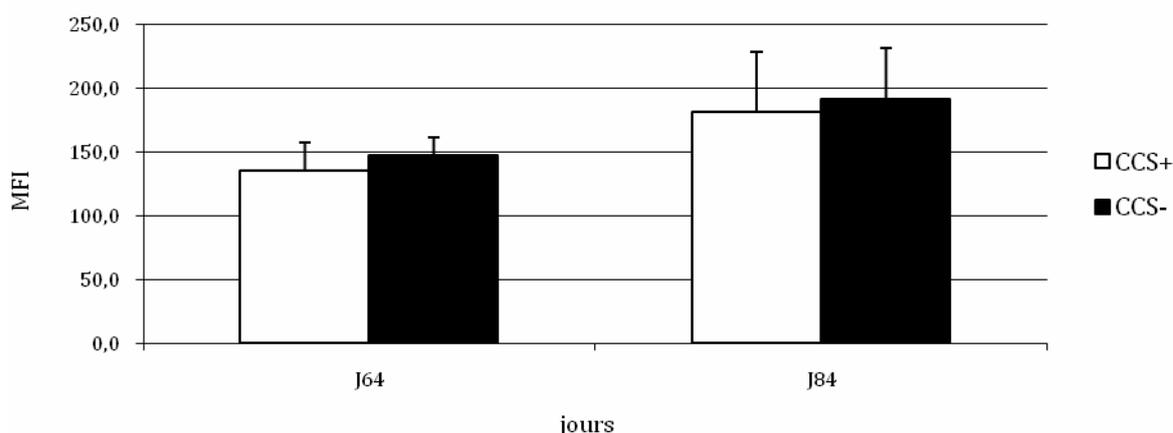
Intensité moyenne de fluorescence du CD44 (Graphique 17):

L'intensité moyenne de fluorescence du marqueur CD44 a augmenté entre J14 et J34, passant de 141 à 187.

A J14 le groupe CCS- avait une intensité moyenne de fluorescence significativement plus élevée que celle du groupe CCS+, avec une valeur de 147,5 contre 137,6 (Student,  $p=0,01$ ).

A J34 le groupe CCS- avait aussi tendance à avoir une intensité moyenne de fluorescence plus élevée, mais cette différence n'était pas significative.

MFI CD44 : comparaison des groupes à J64 et J84.



**Graphique 17** : Valeurs de l'intensité de fluorescence moyenne du marqueur CD44 à J14 et J34 de la seconde infestation : comparaison des groupes CCS+ et CCS-.

- CD25

Le CD25, récepteur de l'Interleukine 2, indique que les lymphocytes T ont été récemment activés, et permet aussi de repérer une population de lymphocytes T dits « régulateurs ».

Le pourcentage de CD25 présenté ici est celui au sein de la population de lymphocytes T CD4<sup>+</sup>.

Deux séries de mesure des cellules exprimant le CD25 ont été réalisées, à J14 et J34.

Les valeurs moyennes ont tendance à augmenter au cours de l'infestation : 18,8% à J14 et 22,7% à J34.

Les deux groupes ont suivi cette tendance, cependant le groupe CCS- a toujours présenté des pourcentages supérieurs à ceux du groupe CCS+ : 24,3% contre 21,2% à J34 (Student, p=0,04).

### III.3.2.3. Monocytes

Le CD14 est un corécepteur au lipopolysaccharide bactérien. Les cellules mononucléées qui expriment le CD14 sont les monocytes.

Le pourcentage de cellules CD14<sup>+</sup> a augmenté pour les deux groupes entre J14 et J34, passant de 5,4% à 6,5%. Le groupe CCS- a présenté des valeurs supérieures à celles du groupe CCS+ : 7,2% contre 5,8% à J34 (Student, p=0,04).

En troisième infestation, le pourcentage moyen de CD14<sup>+</sup> a globalement diminué au cours du temps. Les deux groupes ont présenté des valeurs très différentes au départ, avec 8% pour le groupe CCS- et 6,2% pour le groupe CCS+ (Student, p=0,04). Puis ces valeurs ont diminué, et les deux groupes ont rejoint des valeurs similaires entre elles, autour de 4,5% à J28.

#### III.3.2.4. Lymphocytes B

- CMH II

Le CMH II est exprimé sur différents types cellulaires : lymphocytes B et monocytes sont les deux types cellulaires prépondérants dans le sang qui expriment cette molécule, bien qu'à des niveaux assez différents. Les cellules dendritiques, les macrophages et certains lymphocytes T activés expriment aussi le CMH II, mais sont des populations quantitativement moindres.

Afin de différencier les L<sub>B</sub> et les monocytes, nous avons couplé la détection du CMH II à celle du CD14. Les monocytes expriment le CMH II et le CD14 (population CMH II<sup>+</sup>, CD14<sup>+</sup>) tandis que les L<sub>B</sub> n'expriment que le CMH II (population CMH II<sup>+</sup>, CD14<sup>-</sup>). Les cellules CMH II<sup>+</sup>, CD14<sup>-</sup> seront désignées par défaut « lymphocytes B au sens large » car elles contiennent environ 90% de L<sub>B</sub>, le reste étant représenté par les cellules dendritiques, macrophages et autres cellules exprimant les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité de classe II.

En seconde infestation, les pourcentages en cellules CMH II<sup>+</sup>, CD14<sup>-</sup> ont diminué entre J14 et J34, la valeur moyenne passant de 29,8% à 24,8%.

Le groupe CCS- a présenté des valeurs moyennes supérieures à celle du groupe CCS+ : 33,2% contre 26,5% à J14 (Student, p<0,01) ; et 27,4% contre 22,2% à J34 (Student, p<0,01).

En troisième infestation, les pourcentages moyens en cellules CMH II<sup>+</sup> ont légèrement diminué avant de revenir aux valeurs de J0. Les deux groupes ont suivi la même évolution, le groupe CCS- présentant des valeurs moyennes supérieures à celles du groupe CCS+ tout au long de l'infestation.

Intensité moyenne de fluorescence du CMH II :

La MFI du marqueur CMH II a augmenté entre J14 et J34, la valeur moyenne passant de 7,4 à 10,7.

Aucune différence n'a été constatée entre les deux groupes.

% CMH II élevé :

Le pourcentage de cellules exprimant fortement le marqueur CMH II a augmenté entre J14 et J34, la valeur moyenne des deux groupes passant de 13,9 à 20,6.

Aucune différence n'a été constatée entre les deux groupes.

- CD21 et CD5

Les marqueurs CD21 et CD5 sont exprimés par deux populations exclusives de lymphocytes B.

Ces marquages ont été effectués uniquement au cours de l'évaluation de la réponse mémoire, c'est-à-dire lors de la troisième infestation.

Le pourcentage de cellules CD21<sup>+</sup> a subi une légère augmentation au cours des trois séries de mesures : la valeur moyenne des deux groupes est passée de 23,7% à 25,7 %.

Les deux groupes ont présenté des proportions légèrement différentes de lymphocytes CD21<sup>+</sup>, le groupe CCS- ayant une valeur moyenne supérieure à celle du groupe CCS+.

L'évolution globale en CD5<sup>+</sup> a montré une diminution suivie d'une augmentation, passant de 67,5% à J0 à 56,4 % à J7 puis 69,5% à J28.

Les deux groupes ont suivi cette évolution, le groupe CCS+ présentant des valeurs supérieures à celles du groupe CCS-, bien que l'écart ne fût pas significatif.

### **III.3.3. Résultats en nombre absolu de cellules**

#### **III.3.3.1. Nombre de cellules mononucléées**

##### **III.3.3.1.1. A partir des numérations formules sanguines**

Les résultats présentés sont exprimés en milliers de cellules contenus dans les 5 ml de sang prélevés.

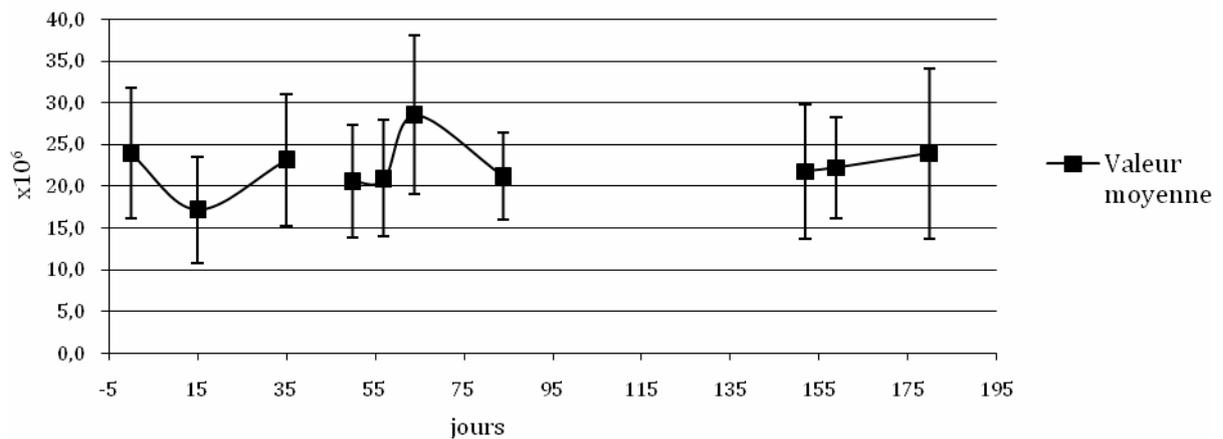
Les populations de lymphocytes et de monocytes de la formule sanguine forment les cellules mononucléées. Le nombre de cellules mononucléées dans les 5 ml de sang prélevés est ainsi calculé à partir des numérations leucocytaires et des formules sanguines.

En première infestation le nombre total de lymphocytes + monocytes était globalement stable, avec une augmentation à J15 (Graphique 18).

En seconde infestation, le nombre total de lymphocytes + monocytes était stable jusqu'à J15 où il a présenté une augmentation à  $28,5 \cdot 10^6$ . Puis les valeurs sont redescendues autour de  $21 \cdot 10^6$ .

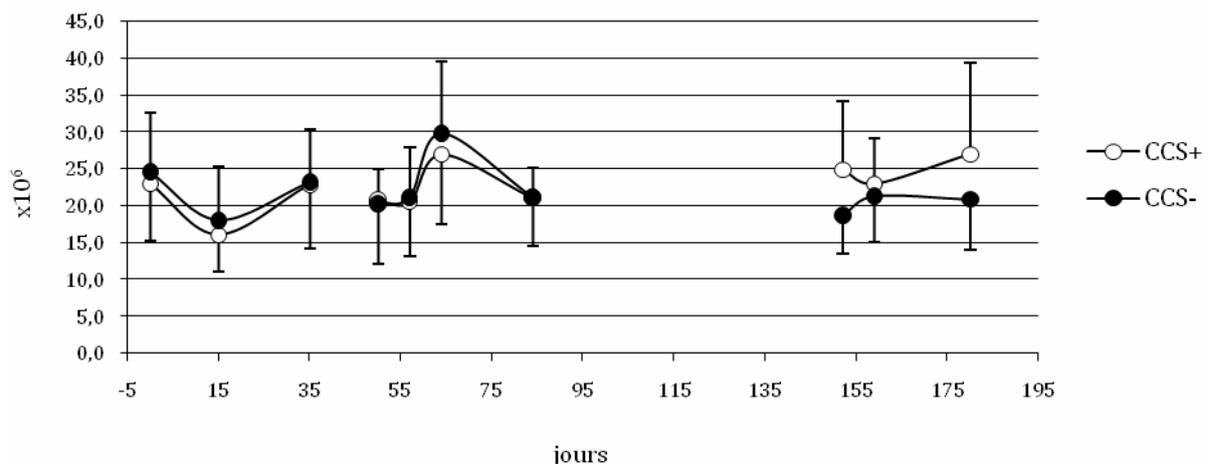
En troisième infestation la valeur moyenne a légèrement augmenté au cours du temps. Le groupe CCS+ a présenté à J0 et J28 des valeurs significativement supérieures à celles du groupe CCS- :  $24,9 \cdot 10^6$  contre  $18,7 \cdot 10^6$  (Student,  $p=0,02$ ) à J0 et  $27 \cdot 10^6$  contre  $20,9 \cdot 10^6$  (Student,  $p<0,05$ ) à J28 (Graphique 19).

Nombre de cellules mononucléées dans 5 ml d'après la formule sanguine :  
évolution moyenne.



**Graphique 18** : Evolution du nombre de cellules mononucléées comptabilisées d'après la numération-formule sanguine au cours des trois infestations : évolution moyenne sur les deux groupes.

Nombre de cellules mononucléées dans 5 ml d'après la formule sanguine :  
comparaison des groupes.



**Graphique 19** : Evolution du nombre de cellules mononucléées comptabilisées d'après la numération-formule sanguine au cours des trois infestations : comparaison des groupes CCS+ et CCS-.

### III.3.3.1.2. A partir des comptages en cellules récupérées après extraction au Ficoll

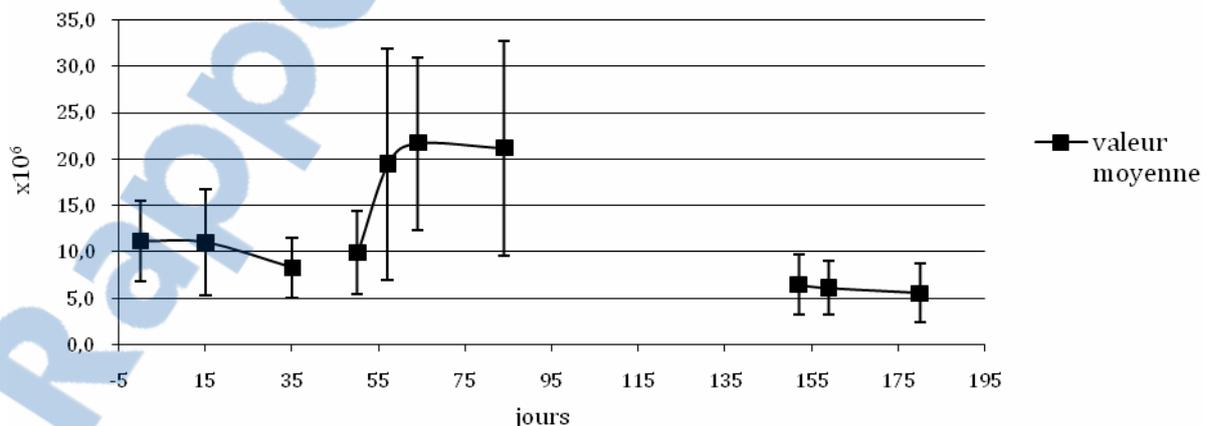
Le comptage des cellules récupérées après isolement sur gradient de Ficoll couplé à la détection de la pureté en cellules mononucléées par cytométrie, a permis d'évaluer les valeurs du nombre de cellules mononucléées récupérées dans 5 ml de sang (correspondant au volume de prélèvement).

Le nombre de PBMC récupérés a légèrement diminué au cours de la première infestation, passant de 11,4 à  $8,8 \cdot 10^6$  cellules dans 5 ml de sang (Graphique 20). Aucune différence n'a été constatée entre les groupes (Graphique 21).

En seconde infestation le nombre de PBMC récupérés a augmenté très fortement puis s'est stabilisé autour de  $23 \cdot 10^6$  cellules dans 5 ml de sang. Les valeurs des deux groupes n'étaient pas significativement différentes, bien qu'en fin d'infestation, un nombre plus élevé de PBMC ait été observé dans le groupe CCS+.

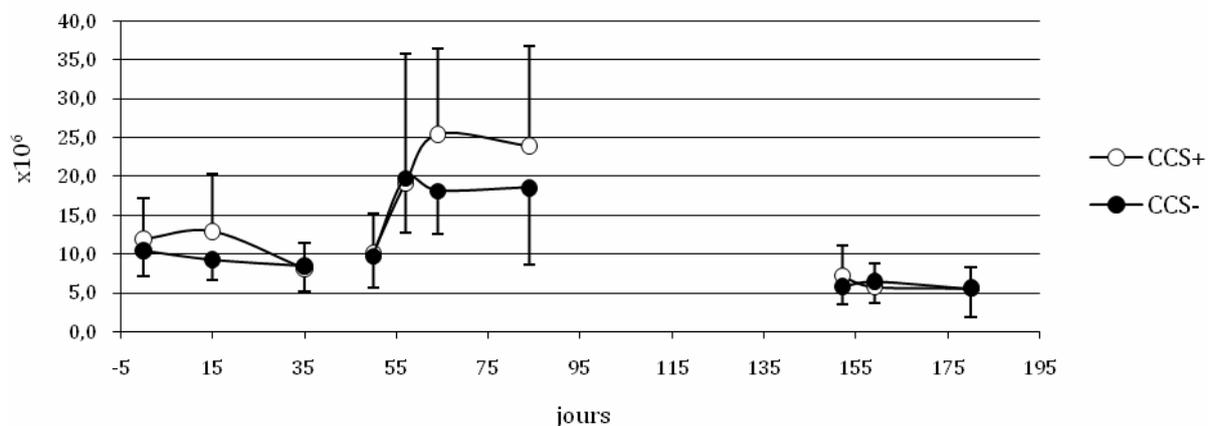
En troisième infestation, le nombre de PBMC était beaucoup plus faible que lors des précédentes infestations : autour de  $6 \cdot 10^6$  cellules dans 5 ml de sang. Il n'a presque pas évolué au cours de l'infestation, et les valeurs des deux groupes n'étaient pas différentes.

Nombre de cellules mononucléées dans 5 ml, récupérées après extraction au Ficoll : évolution moyenne.



**Graphique 20** : Evolution du nombre de cellules mononucléées récupérées après extraction au Ficoll au cours des trois infestations : évolution moyenne sur les deux groupes.

Nombre de cellules mononucléées dans 5 ml, récupérées après extraction au Ficoll : comparaison des groupes.



**Graphique 21** : Evolution du nombre de cellules mononucléées récupérées après extraction au Ficoll au cours des trois infestations : comparaison des groupes CCS+ et CCS-.

### III.3.3.1.3. Comparaison des deux séries de valeurs

Le nombre théorique de cellules mononucléées est calculé, à partir du nombre total de cellules sanguines (numération) et de la composition en lymphocytes et monocytes (formule).

Le nombre observé de cellules mononucléées est donné par la détermination de la pureté des PBMC au FACS couplée à la numération par le compteur automatique, après séparation des PBMC sur gradient de Ficoll.

Les différences obtenues entre ces différentes méthodes de comptage des cellules mononucléées sont reportées dans le Tableau 3.

**Tableau 3 : Comparaison entre le nombre de cellules mononucléées observé et le nombre théorique dans le sang ( $\times 10^6$  dans 5 ml de sang).**

<b>Réponse primaire - 1ère et 2ème infestations – Numération et Formule manuelles</b>							
	<b>J0</b>	<b>J14</b>	<b>J35</b>	<b>J50</b>	<b>J57</b>	<b>J64</b>	<b>J84</b>
<b>PBMC théorique</b> (numération - formule)	25.0	16.8	22.6	21.3	21.3	28.5	21.4
<b>PBMC observé</b> (Ficoll - comptage)	11.4	11.0	8.8	9.9	20.8	24.0	23.2
<b>% de la fraction récupérée</b>	45	63,8 63,9 5	39,1 39,2 9	46,3 46,3 3	96,5 96,3 0	83,4 96,5 1	108,8 83,4 32

<b>Réponse mémoire - 3ème infestation – Numération manuelle, Formule machine</b>			
	<b>J0</b>	<b>J7</b>	<b>J28</b>
<b>PBMC théorique</b> (numération - formule)	21.7	22.2	23.9
<b>PBMC observé</b> (Ficoll - comptage)	6.5	6.5	5.9
<b>% de la fraction récupérée</b>	29,7	27,6	23,3

Il faut tout d'abord noter que la valeur observée après séparation à l'aide du Ficoll est toujours inférieure à la valeur théorique calculée, sauf le dernier jour de la seconde infestation.

Le rendement est le plus élevé en fin de seconde infestation, soit lorsque nous avons constaté que de nombreuses cellules étaient activées. L'activation des cellules modifie leur densité et donc leur capacité à traverser ou pas le gradient de Ficoll ; cet élément est susceptible de créer un biais dans la collecte des cellules.

### III.3.3.2. Analyse des populations cellulaires

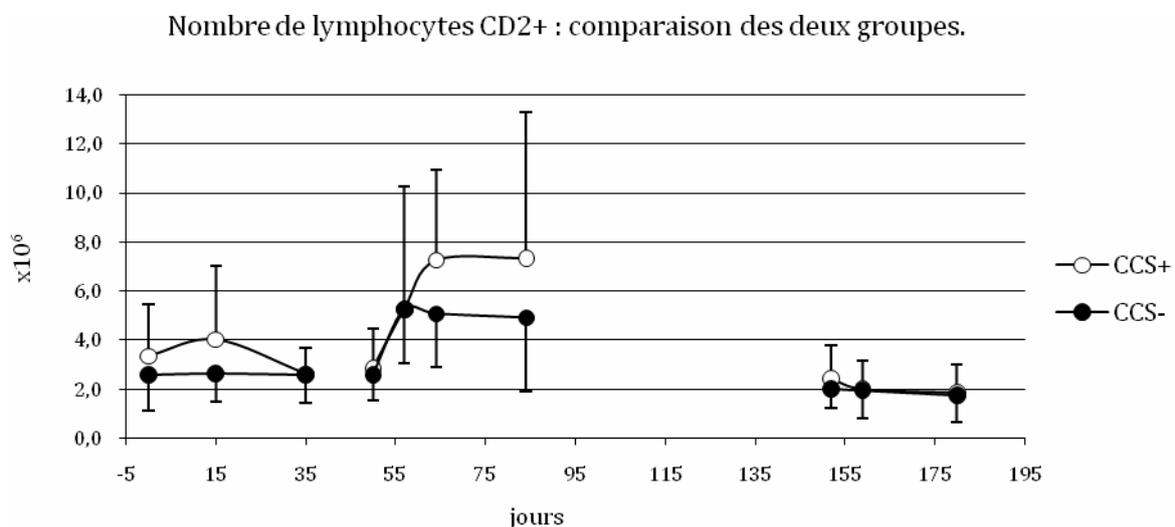
Le nombre absolu de cellules appartenant à chaque catégorie a été calculé à partir du nombre de cellules mononucléées récupérées après Ficoll, de la pureté des cellules obtenues et du pourcentage de chaque catégorie obtenu en cytométrie. Il est exprimé en nombre de cellules contenues dans 5 ml de sang.

#### III.3.3.2.1. Les lymphocytes T

En première infestation, le nombre de  $L_T$  est resté stable, avec des valeurs moyennes autour de  $3.10^6$  cellules dans 5 ml de sang. Les valeurs des deux groupes n'étaient pas différentes (Graphique 22).

En seconde infestation, le nombre de  $L_T$  a subi une augmentation, avant de se stabiliser autour de  $6,5.10^6$ . Les deux groupes ont évolué différemment, le groupe CCS+ présentant des valeurs supérieures à celles du groupe CCS-. La différence est significative à J34 ou le groupe CCS+ avait  $7,6.10^6$  lymphocytes dans 5 ml de sang tandis que le groupe CCS- en avait  $5,3.10^6$  (Student,  $p=0,05$ ).

En troisième infestation, le nombre de  $L_T$  circulants était à nouveau très bas, et est resté stable autour d'une valeur moyenne de  $2.10^6$ . Les valeurs des deux groupes n'étaient pas différentes.



**Graphique 22** : Evolution du nombre de lymphocytes CD2<sup>+</sup> au cours des trois infestations : comparaison des groupes CCS+ et CCS-.

- Les lymphocytes CD4

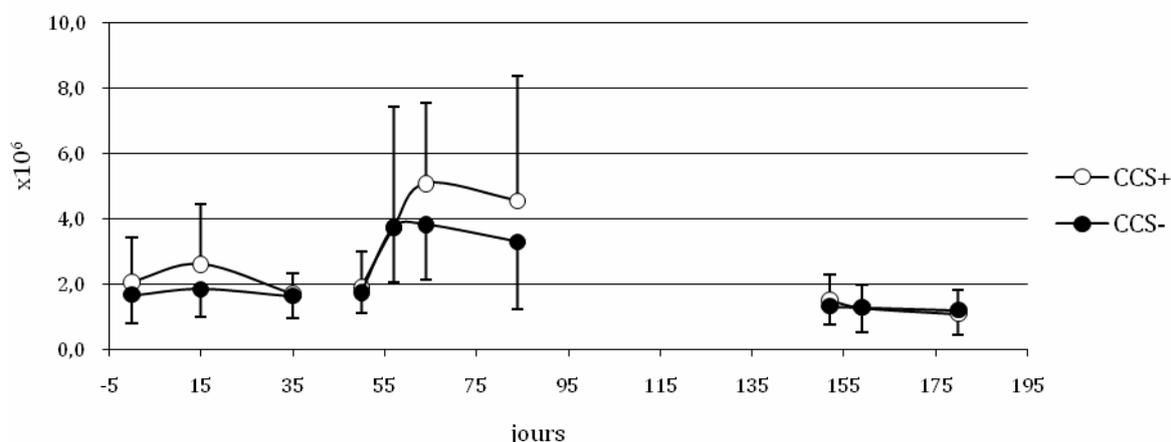
Le nombre de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> a évolué de la même façon que le nombre total de lymphocytes (Graphique 23).

En première infestation, le nombre de L<sub>T</sub>CD4<sup>+</sup> est resté stable avec des valeurs moyennes autour de 2.10<sup>6</sup> cellules dans 5 ml de sang ; et les valeurs des deux groupes étaient proches.

En seconde infestation, le nombre de L<sub>T</sub>CD4<sup>+</sup> a globalement augmenté. Cependant les deux groupes ont divergé : le groupe CCS+ a présenté une augmentation puis une stabilisation, tandis que le groupe CCS- a présenté une augmentation jusqu'à J14 puis une légère diminution, cette différence n'étant toutefois pas significative.

En troisième infestation, le nombre de L<sub>T</sub>CD4<sup>+</sup> a subi une légère diminution, la valeur moyenne passant de 1,4.10<sup>6</sup> à J0 à 1,1.10<sup>6</sup> à J28. Les valeurs des deux groupes n'étaient pas significativement différentes.

Nombre de lymphocytes CD4<sup>+</sup> : comparaison des deux groupes.



**Graphique 23** : Evolution du nombre de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> au cours des trois infestations : comparaison des groupes CCS+ et CCS-.

- Les lymphocytes CD8

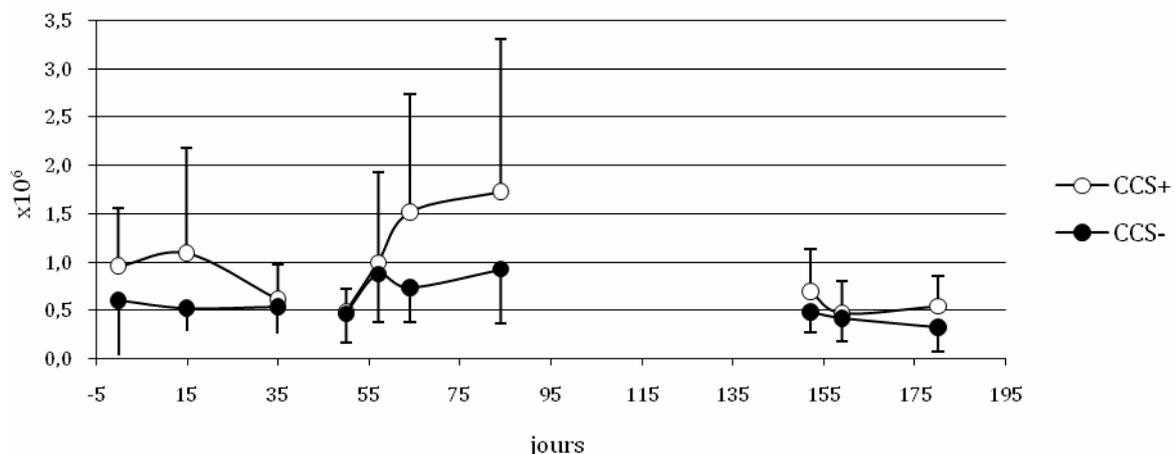
Le nombre de L<sub>T</sub>CD8<sup>+</sup> est resté globalement stable en première infestation, avec des valeurs moyennes de 0,8.10<sup>6</sup> cellules dans 5 ml de sang (Graphique 24). Le groupe CCS+ a montré des valeurs supérieures à celles du groupe CCS-, avec à J15 une valeur de 0,9.10<sup>6</sup> contre 0,6.10<sup>6</sup> pour le groupe CCS- (Student, p<0,05).

En seconde infestation, le nombre de  $L_T CD8^+$  a augmenté avant de se stabiliser. Le groupe CCS+ a encore une fois montré des valeurs plus importantes avec à J34 une moyenne de  $1,8 \cdot 10^6$  contre  $1,5 \cdot 10^6$  pour les CCS- (Student,  $p=0,02$ ).

En troisième infestation, les valeurs moyennes étaient inférieures à celles rencontrées lors des deux infestations précédentes, se situant autour de  $0,5 \cdot 10^6$ . Le nombre de  $L_T CD8^+$  a légèrement diminué entre J0 et J14, puis s'est stabilisé.

Le groupe CCS+ a, dès le premier jour, eu tendance à avoir une quantité supérieure de  $L_T CD8^+$ , et à J28 les valeurs des deux groupes étaient significativement différentes : le groupe CCS+ avait  $0,5 \cdot 10^6$   $L_T CD8^+$  tandis que le groupe CCS- en avait  $0,3 \cdot 10^6$  (Student,  $p=0,02$ ).

Nombre de lymphocytes CD8+ : comparaison des deux groupes.



**Graphique 24** : Evolution du nombre de lymphocytes T CD8+ au cours des trois infestations : comparaison des groupes CCS+ et CCS-.

*Remarque* : Le groupe de 31 animaux ne semble pas ici être absolument représentatif du groupe précédent : en effet à plusieurs reprises les différences entre groupes qui n'étaient avec 53 animaux que des tendances deviennent significatives.

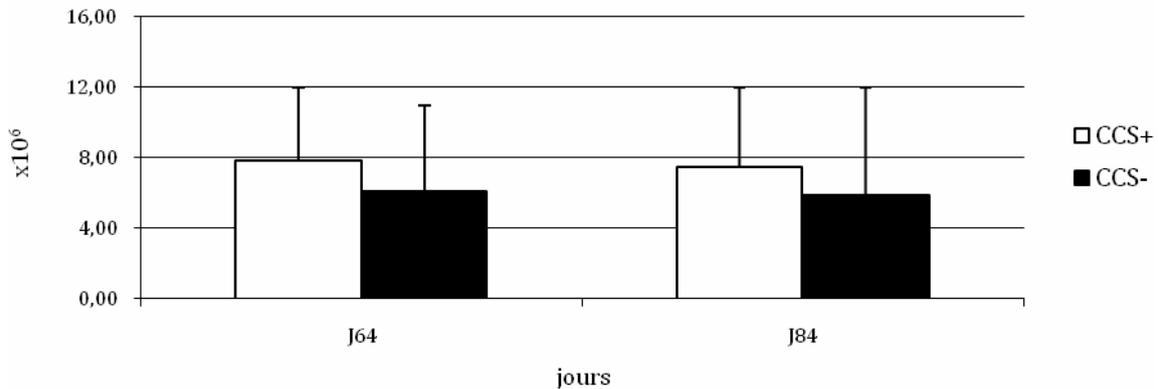
- Les lymphocytes  $\gamma\delta$

En seconde infestation, le nombre de  $L_T \gamma\delta$  n'a pas évolué entre les deux séries de prélèvements. A J14, le groupe CCS+ a présenté une valeur légèrement supérieure à celle du groupe CCS-, avec une moyenne de  $7,9 \cdot 10^6$  contre  $6,1 \cdot 10^6$  cellules dans 5 ml de sang.

A J34, on retrouve la même tendance entre les groupes, avec une valeur  $7,5 \cdot 10^6$  de pour le groupe CCS+ et de  $5,9 \cdot 10^6$  pour le groupe CCS- (Graphique 25).

En troisième infestation, le nombre de  $L_T\gamma\delta$  n'a pas évolué, les valeurs moyennes ont stagné autour de  $1,1 \cdot 10^6$  cellules dans 5 ml de sang. Les valeurs des deux groupes n'étaient pas différentes.

Nombre de lymphocytes T  $\gamma\delta$  (marqueur WC1) : comparaison des groupes à J64 et J84.



**Graphique 25** : Nombre de lymphocytes T  $\gamma\delta$  à J14 et J34 de la seconde infestation : comparaison des groupes CCS+ et CCS-.

### III.3.3.2.2. Les marqueurs d'activation des lymphocytes

- CD44

C'est au cours de la seconde infestation que l'expression du CD44 a été évaluée. Le nombre de  $L_TCD4^+ CD44^+$  a légèrement diminué entre les deux séries de prélèvements.

A J14, la moyenne des deux groupes était de  $1,2 \cdot 10^6$ . A J34 elle était de  $0,9 \cdot 10^6$ . Les valeurs des deux groupes étaient similaires.

- CD25

Le nombre de  $L_TCD4^+ CD25^+$  n'a pas évolué entre les deux séries de prélèvements. La valeur moyenne était de  $0,8 \cdot 10^6$  à J14 et de  $1,0 \cdot 10^6$  à J34. Les valeurs des deux groupes n'étaient pas différentes.

### III.3.3.2.3. Les monocytes

Le nombre de monocytes (marqués à l'aide d'un anticorps anti-CD14) n'a pas évolué au cours de la seconde infestation. Les valeurs moyennes étaient de  $1,2 \cdot 10^6$  à J14 et de  $1,3 \cdot 10^6$  à J34. Les deux groupes ont présenté des valeurs proches.

En troisième infestation, le nombre de CD14<sup>+</sup> a légèrement diminué entre J0 et J7. La valeur moyenne à J0 était de  $0,44 \cdot 10^6$ , tandis que les valeurs à J7 et J28 étaient très proches ; respectivement  $0,29$  et  $0,24 \cdot 10^6$ . Les valeurs des deux groupes n'étaient pas différentes.

#### III.3.3.2.4. Les lymphocytes B

- CMH II

En seconde infestation le nombre de cellules CMH II<sup>+</sup> a légèrement diminué entre les deux séries de prélèvements. A J14 la valeur moyenne était de  $7,0 \cdot 10^6$ , et à J34 de  $5,5 \cdot 10^6$ .

Aucune différence notable n'a été constatée entre les valeurs des deux groupes.

En troisième infestation, le nombre de CMH II<sup>+</sup> était beaucoup plus faible qu'en seconde infestation : la valeur moyenne à J0 était de  $2,5 \cdot 10^6$ . Les valeurs à J7 et J28 étaient comparables : respectivement  $2 \cdot 10^6$  et  $1,9 \cdot 10^6$ .

Les deux groupes se sont comportés de façon identique.

- CD21 et CD5

Le nombre de lymphocytes CD21<sup>+</sup> n'a pas évolué au cours de la troisième infestation, avec une moyenne autour de  $1,4 \cdot 10^6$ .

Le nombre de lymphocytes CD5<sup>+</sup> a légèrement diminué entre J0 et J7 de la troisième infestation, la valeur moyenne passant de  $4,3 \cdot 10^6$  à  $3,4 \cdot 10^6$ . Ce nombre s'est stabilisé ensuite, avec une valeur de  $3,7 \cdot 10^6$  à J28.

Le groupe CCS+ avait tendance à J0 à avoir un nombre plus élevé de CD5<sup>+</sup> que le groupe CCS-, mais par la suite les valeurs des deux groupes sont redevenues très proches.

### III.4. Analyse des cellules du nœud lymphatique drainant la caillette

#### III.4.1. Poids des nœuds lymphatiques

Le ou les nœuds lymphatiques de drainage de la caillette (nœuds lymphatiques abomasaux) ont été prélevés, et pesés, après que la graisse a été retirée.

Lors de la première série d'abattages qui ont été réalisés en fin de seconde infestation, le groupe CCS+ présentait un poids moyen de nœud lymphatique supérieur à celui du groupe CCS- : 5,5 grammes en moyenne contre 4,0 grammes (Student,  $p=0,04$ ).

Lors de la seconde série d'abattages en fin de troisième infestation, les deux groupes présentaient des poids moyens de nœuds lymphatiques très proches : 3,4 et 3,5 grammes respectivement.

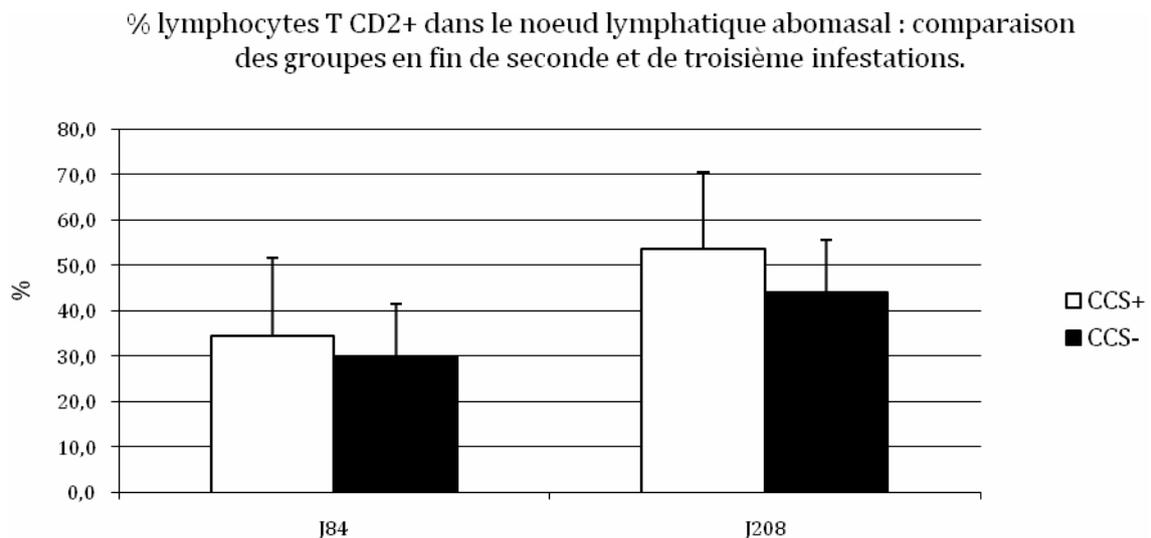
### III.4.2. Phénotypage des cellules

#### III.4.2.1. Les lymphocytes T

En fin de seconde infestation, les deux groupes présentaient des proportions de lymphocytes T ganglionnaires qui étaient proches, avec en moyenne 32,4% de CD2<sup>+</sup> (Graphique 26). A la même période le pourcentage était de 27,5% dans le sang.

En fin de troisième infestation (J56), la valeur moyenne des deux groupes était de 48,9 % de lymphocytes CD2<sup>+</sup> dans le nœud lymphatique.

Le groupe CCS- avait significativement plus de lymphocytes T que le groupe CCS+ : 53,7% contre 44,1% (Student, p=0,04).



**Graphique 26** : Pourcentage de lymphocytes CD2<sup>+</sup> dans le nœud lymphatique abomasal en fin de seconde et de troisième infestation : comparaison des groupes CCS+ et CCS-.

**Intensité moyenne de fluorescence du CD2 :**  
L'intensité moyenne de fluorescence du marqueur CD2 des cellules du nœud lymphatique était de 46 à J34 de la seconde infestation. Dans les cellules du sang elle était de 102,3 à cette même date.

#### III.4.2.1.1. Les lymphocytes T CD4

En fin de seconde infestation, les pourcentages moyens de  $L_TCD4^+$  étaient comparables entre les deux groupes, le groupe CCS- présentant une valeur légèrement supérieure (Graphique 27). La valeur moyenne dans le nœud lymphatique était de 57,3%, tandis que celle dans le sang au même jour était de 64,2%.

En fin de troisième infestation, le groupe CCS- présentait des valeurs supérieures à celles du groupe CCS+ : 66,9% contre 61,9% (Student,  $p < 0,05$ ) (Graphique 28). La moyenne était plus élevée en fin de troisième infestation qu'en fin de seconde infestation : 64,4% à J56 contre 57,3% à J34 de la seconde infestation.

Intensité moyenne de fluorescence du CD4 :  
L'intensité moyenne de fluorescence du marqueur CD4 des cellules du nœud lymphatique était de 31 à J34 de la seconde infestation. Au même jour, elle était de 42,9 pour les  $L_TCD4^+$  du sang.

#### III.4.2.1.2. Les lymphocytes T CD8

En fin de seconde infestation, la valeur moyenne des deux groupes était de 10,4% de  $L_TCD4^+$  dans le nœud lymphatique. A la même date, elle était de 21,6% dans le sang.

Le groupe CCS+ présentait une valeur moyenne significativement supérieure au groupe CCS : 11,6% contre 9,1% (Student,  $p = 0,04$ ) (Graphique 27).

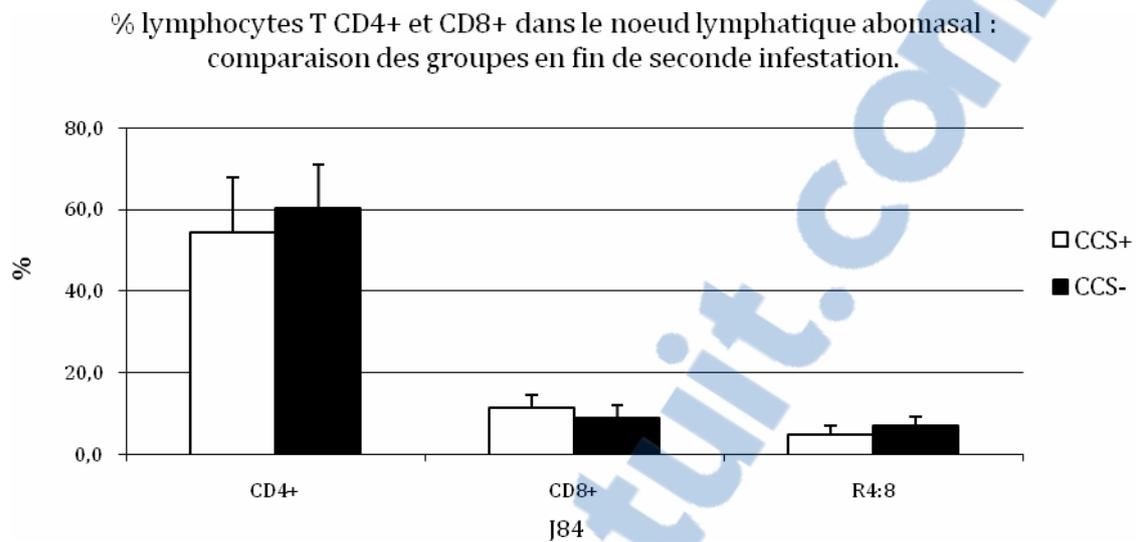
En fin de troisième infestation, la valeur moyenne des deux groupes était de 19,5%. Le groupe CCS+ avait le plus grand pourcentage de cellules exprimant le récepteur au CD8 : 22,7% contre 16,3% dans le groupe CCS- (Student,  $p < 0,01$ ) (Graphique 28).

#### III.4.2.1.3. Rapport CD4 / CD8

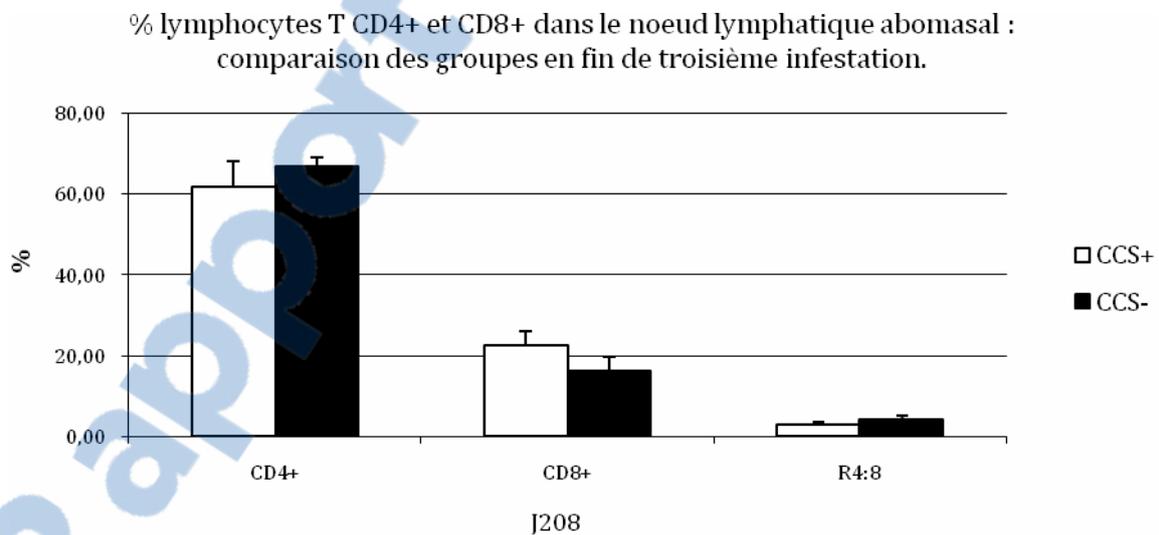
En fin de seconde infestation, la valeur moyenne des deux groupes du rapport CD4/CD8 dans le nœud lymphatique était de 6 à J34. La valeur au même jour dans le sang était de 3,4.

Le groupe CCS- présentait un rapport significativement plus élevé que celui du groupe CCS+ : 7,1 contre 5,0 (Student,  $p = 0,02$ ) (Graphique 27).

En fin de troisième infestation, la valeur moyenne du rapport CD4/CD8 était de 3,4. Le groupe CCS- présentait une valeur moyenne significativement plus élevée que celle du groupe CCS+ : 4,2 contre 2,8 (Student,  $p < 0,01$ ) (Graphique 28).



**Graphique 27** : Pourcentages de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> dans le nœud lymphatique abomasal en fin de seconde infestation : comparaison des groupes CCS+ et CCS-.



**Graphique 28** : Pourcentages de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> dans le nœud lymphatique abomasal en fin de troisième infestation : comparaison des groupes CCS+ et CCS-.

#### III.4.2.1.4. Les marqueurs d'activation des lymphocytes

- CD44

La valeur moyenne de lymphocytes surexprimant le CD44 était de 39,9% dans le nœud lymphatique à J34 de la seconde infestation. La valeur dans le sang au même jour était de 19,8%.

Le groupe CCS- présentait des valeurs légèrement plus élevées que le groupe CCS+ : 45,0% contre 34,7%.

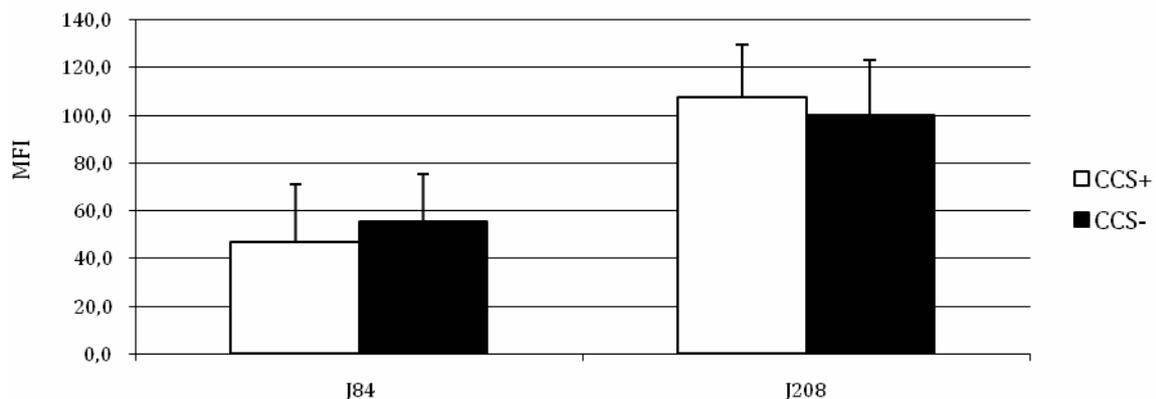
Intensité moyenne de fluorescence du CD44 :

L'intensité moyenne de fluorescence du marqueur CD44 des cellules du nœud lymphatique étaient de 51,3 à J34 de la seconde infestation et de 103,9 à J56 de la troisième infestation : l'intensité de fluorescence a beaucoup augmenté entre les deux infestations.

L'intensité moyenne de fluorescence du marqueur CD44 dans le sang était de 186,5 en fin de seconde infestation.

A J34 de la seconde infestation, c'était le groupe CCS- qui présentait les valeurs les plus élevées ; tandis qu'à J56 de la troisième infestation c'était le groupe CCS+ (Graphique 29).

Intensité moyenne de fluorescence du marqueur CD44 dans le nœud lymphatique abomasal : comparaison des deux groupes.



**Graphique 29** : Intensité moyenne de fluorescence du marqueur CD44 dans le nœud lymphatique abomasal en fin de seconde et de troisième infestation : comparaison des groupes CCS+ et CCS-.

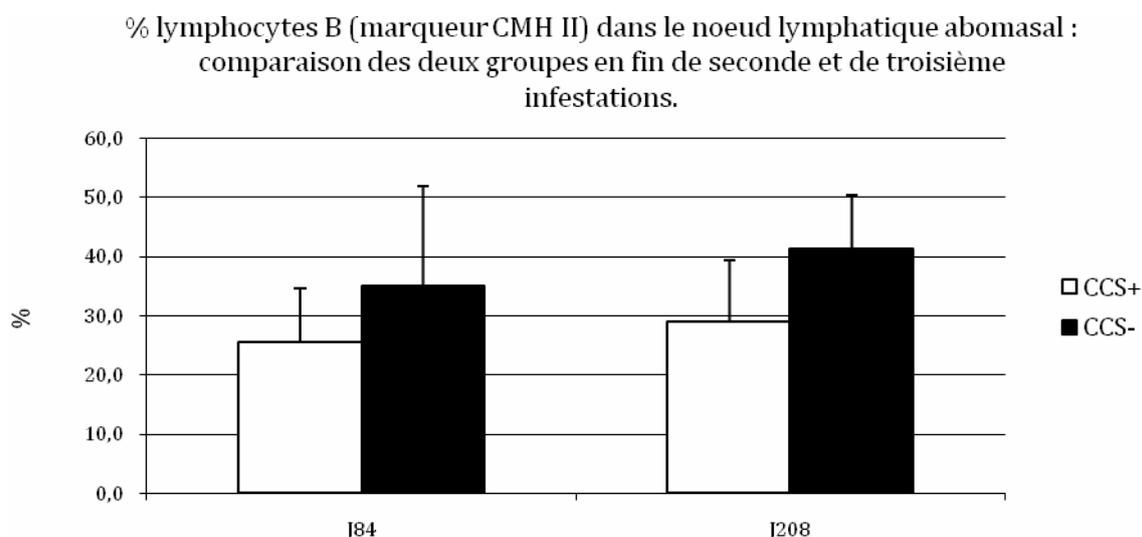
- CD25

Le pourcentage de cellules exprimant le CD25 a augmenté entre les deux infestations : les valeurs étaient de 11,3% en moyenne sur les deux groupes à J34 de la seconde infestation, et 20,2% à J56 de la troisième infestation. La moyenne était de 22,7% dans le sang à J34 de la seconde infestation. Les deux groupes présentaient à chaque fois des valeurs moyennes proches.

### III.4.2.2. Les lymphocytes B

- CMH II

Le pourcentage de cellules exprimant le CMH II était de 30,3% à J34 de la seconde infestation ; et de 35% à J56 de la troisième infestation (Graphique 30). Il était de 24,8% dans le sang à J34 de la seconde infestation. Le groupe CCS- a présenté systématiquement une valeur moyenne supérieure à celle du groupe CCS+ : 41,1% contre 28,9% en fin de troisième infestation (Student,  $p=0,03$ ).



**Graphique 30** : Pourcentage de lymphocytes B dans le nœud lymphatique abomasal en fin de seconde et de troisième infestation : comparaison des groupes CCS+ et CCS-.

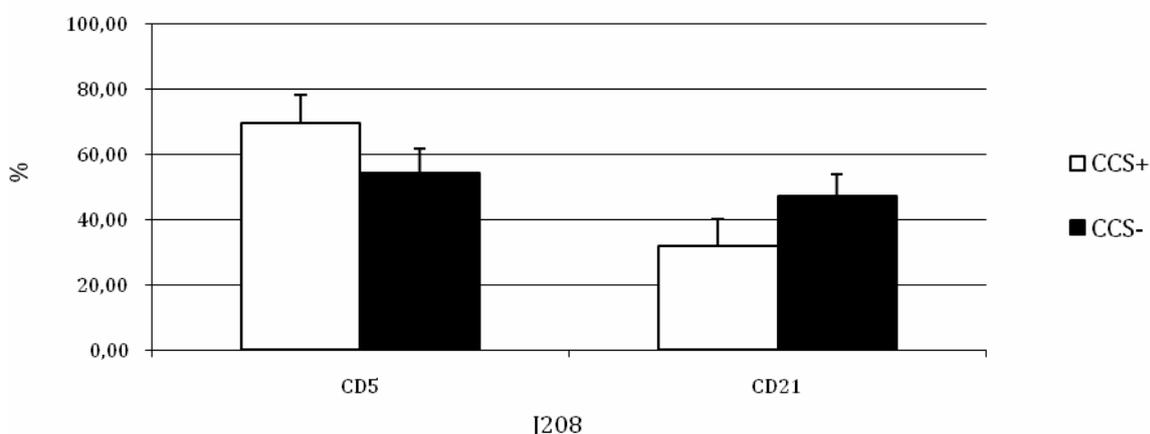
- CD21 et CD5

Ces récepteurs n'ont été recherchés qu'en fin de troisième infestation.

Le groupe CCS- présentait des valeurs de  $L_B CD21^+$  significativement supérieures à celles du groupe CCS+ : 47,1% contre 32% (Student,  $p < 0,005$ ) (Graphique 31).

A l'inverse, le groupe CCS+ présentait des valeurs de  $L_B CD5^+$  significativement supérieures à celles du groupe CCS-, avec 69,6% contre 54,4% (Student,  $p < 0,01$ ).

Répartition des lymphocytes B  $CD5^+$  et  $CD21^+$  dans le nœud lymphatique abomasal : comparaison des groupes en fin de troisième infestation.



**Graphique 31** : Pourcentages de lymphocytes B  $CD5^+$  et  $CD21^+$  dans le nœud lymphatique abomasal en fin de troisième infestation : comparaison des groupes CCS+ et CCS-.

### III.4.2.3. Comparaison avec les résultats obtenus avec les PBMC

Le Tableau 4 résume les différences observées entre les résultats obtenus dans le sang et ceux obtenus dans le nœud lymphatique abomasal à J34 de la seconde infestation.

**Tableau 4** : Compositions du sang et du nœud lymphatique abomasal.

	% CD2 <sup>+</sup>	% CD4 <sup>+</sup>	% CD8 <sup>+</sup>	RCD4/CD8	% CD44 <sup>+</sup>	MFI CD44	% CD25 <sup>+</sup>	% CMH II <sup>+</sup>
Sang	27,5	64,2	21,6	3,4	19,8	186,5	22,7	24,8
Nœud lymphatique	32,4	57,3	10,4	6	39,9	51,3	11,3	30,3

## III.5. **Autres résultats**

### III.5.1. **Pepsinogène sanguin**

Le taux de pepsinogène sanguin est un marqueur des lésions tissulaires de la paroi muqueuse de la caillette.

En première infestation, le pepsinogène a augmenté fortement jusqu'à J21 où il a atteint un maximum avec une valeur moyenne de 1,5 UTyr/ml. Il a ensuite diminué (Graphique 32).

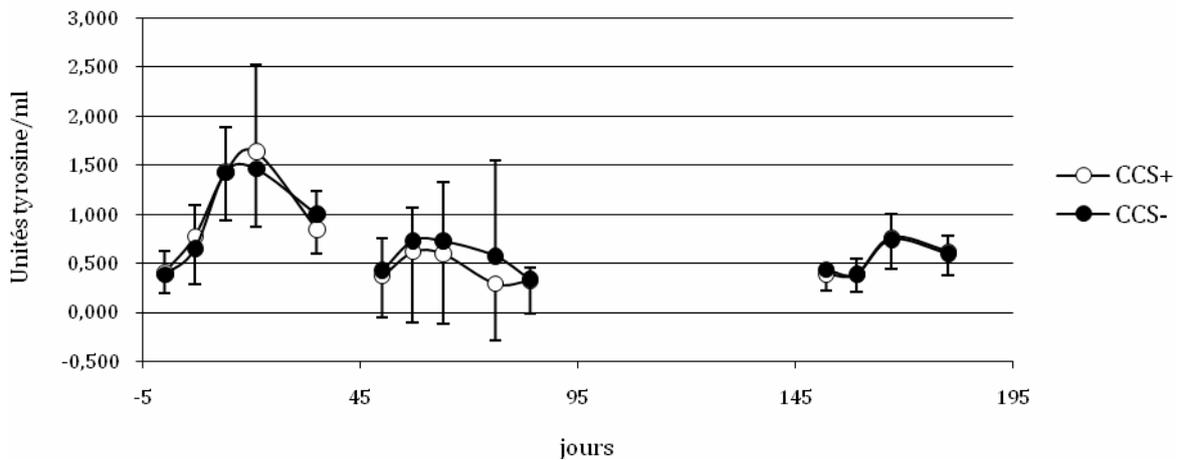
Le groupe CCS+ a présenté des valeurs légèrement supérieures à celles du groupe CCS-.

En seconde infestation, le pepsinogène a repris à J0 des valeurs comparables à celles à J0 de la seconde infestation. Il a ensuite légèrement augmenté avec un maximum de 0,7 UTyr/ml à J7, puis diminué jusqu'aux valeurs de départ.

Les valeurs des deux groupes ont suivi la même évolution.

En troisième infestation, la valeur de départ était encore autour de 0,4 UTyr/ml. Le pepsinogène a ensuite augmenté et atteint un maximum de 0,7 UTyr/ml 15 jours après le début de l'infestation, puis a eu tendance à diminuer en fin d'infestation. Aucune différence n'a été constatée entre les deux groupes.

### Pepsinogène sanguin : comparaison des deux groupes.



**Graphique 32** : Evolution du pepsinogène sanguin au cours des trois infestations : comparaison des groupes CCS+ et CCS-.

### III.5.2. Hématocrite

L'hématocrite est le rapport entre la fraction globulaire du sang et le volume total.

- Valeurs obtenues manuellement : Quatre séries de mesures pour chaque infestation (Sur les deux premières infestations seulement).

La valeur de l'hématocrite était de 32,4 % en moyenne sur les deux groupes en début d'infestation (J7). L'hématocrite a chuté ensuite durant toute la première infestation, jusqu'à atteindre une valeur moyenne de 22,2 % à J35.

Les deux groupes ont montré la même tendance et le groupe CCS- avait des valeurs supérieures à celles du groupe CCS+ : 33,3 % contre 31,6 % à J7 (Student,  $p=0,01$ ).

En début de seconde infestation les valeurs sont remontées, puis après une légère augmentation à J14, l'hématocrite a diminué à nouveau pour les deux groupes.

Comme lors de la première infestation, le groupe CCS- avait des valeurs supérieures à celles du groupe CCS+ : 31 % contre 29,6 % à J7 (Student,  $p<0,01$ ) et 31,6 % contre 30,4 % à J14 (Student,  $p<0,05$ ).

- Valeurs obtenues par la machine : Trois séries de mesures pour chaque infestation (Sur la totalité des trois infestations).

En première infestation, l'hématocrite a chuté de 33,1 % à 22,8 % en moyenne sur les deux groupes (Graphique 33).

Le groupe CCS- avait dès le premier jour des valeurs supérieures à celles du groupe CCS+ : 31,4 % contre 29,7 % à J0 (Student,  $p=0,01$ ), 29,3 % contre 28,2 % à J14 (Student,  $p=0,04$ ).

En seconde infestation, l'hématocrite a augmenté avant de diminuer.

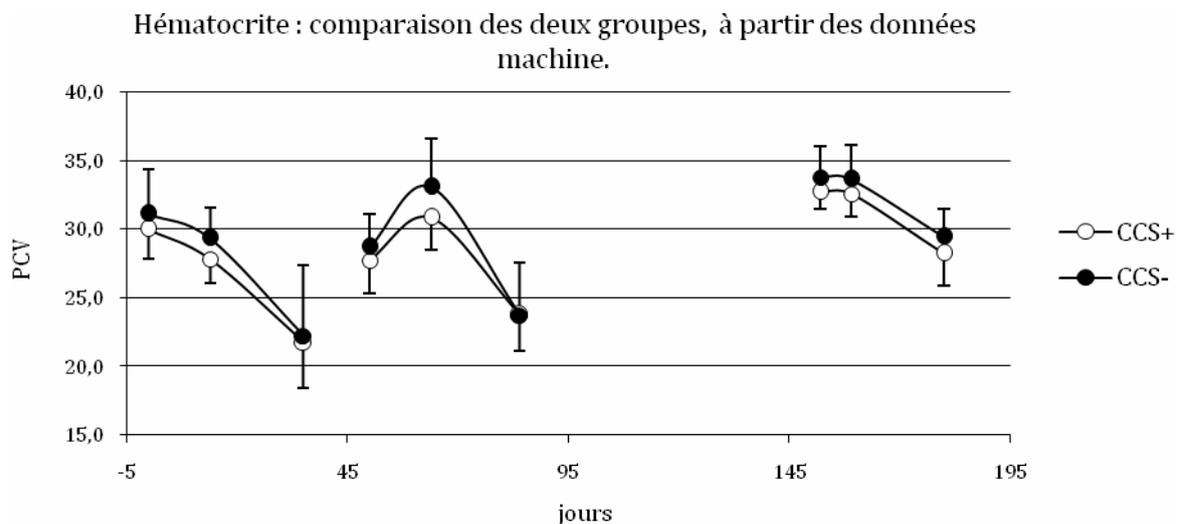
Le groupe CCS- a montré une augmentation plus nette à J14, avec une valeur de 32,7% contre 31,2% pour le groupe CCS+ (Student,  $p=0,02$ ). Les valeurs du groupe CCS- sont ensuite redescendues fortement puisqu'en fin d'infestation les valeurs des deux groupes étaient à nouveau similaires.

*Remarque* : Les deux courbes de l'hématocrite au cours du temps, manuelle et machine, sont similaires et montrent la même évolution entre les groupes.

En troisième infestation, l'hématocrite a présenté dès le début des valeurs supérieures à celles observées lors des deux premières infestations : 33,3 % en moyenne à J0.

Il a ensuite diminué au cours de l'infestation, jusqu'à 28,9 % à J28.

Les deux groupes n'ont pas présenté de différence significative, bien que les valeurs du groupe CCS- aient eu tendance à être supérieures à celles du groupe CCS+.



**Graphique 33** : Evolution de l'hématocrite au cours des trois infestations : comparaison des groupes CCS+ et CCS- (données de la machine).

*Remarque* : L'hématocrite a tellement chuté chez certains animaux qu'avant J35 de la première infestation il a été décidé de les vermifuger afin de stopper la spoliation sanguine d'origine parasitaire.

### **III.5.3. Infestation parasitaire**

Les paramètres qui ont été mesurés sont :

- le nombre total de vers qui, ramené aux 10 000 larves qui ont été administrées, donne le pourcentage d'installation parasitaire.
- la longueur des vers femelles. Cette longueur est corrélée à celle de l'utérus et donc à la fécondité des vers femelles.
- le pourcentage de formes immatures (L3, L4, adultes immatures) au sein de la population totale.

- En fin de seconde infestation

A J34 de la seconde infestation, le niveau d'installation était de 44,2 % en moyenne.

La longueur moyenne des femelles adultes était de 19,1 mm en moyenne.

Aucune différence n'a été observée entre les deux groupes pour le pourcentage d'installation et pour la longueur des vers.

Les formes immatures représentaient 7,0 % de la population en moyenne, avec une différence significative entre les deux groupes ; le groupe CCS+ présentant un pourcentage plus élevé de formes immatures dans la population que le groupe CCS- (Student,  $p=0,03$ ).

- En fin de troisième infestation

A J56 de la troisième infestation, le niveau d'installation était plus faible qu'à la suite de la deuxième infestation et était de 31,9 % en moyenne. Le groupe CCS+ avait tendance à avoir un pourcentage d'installation plus élevé, mais ce n'était pas significatif (Student,  $p=0,08$ ).

La longueur moyenne des femelles était de 18,5mm.

Il y avait en moyenne 5,3 % de formes immatures parmi les vers récoltés.

Les deux groupes avaient des valeurs proches.

### **III.5.4. Poids des animaux**

En fin de seconde infestation, le poids des animaux était de 56 kg en moyenne après abattage. Il n'y avait pas de différence entre les groupes.

En fin de troisième infestation, le poids moyen des animaux était de 62 kg, soit 6 kg de plus gagnés en 124 jours, ce qui correspond à un GMQ de 50g en moyenne. Il n'y avait pas de différence entre les groupes.

### III.5.5. Réponse anticorps : tests ELISA

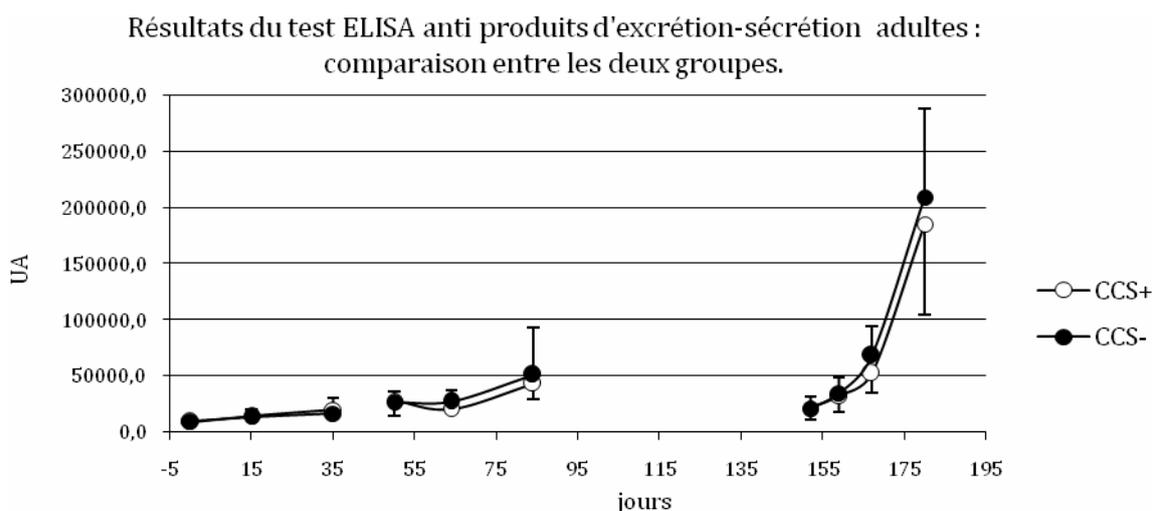
Deux types de réponse anticorps ont été recherchés : la réponse contre les larves L3 et la réponse contre les produits d'excrétion-sécrétion extraits de vers adultes.

#### III.5.5.1. Anticorps dirigés contre les produits d'excrétion/sécrétion

En première infestation, la réponse anticorps a augmenté faiblement ; la valeur moyenne sur les deux groupes est passée de 9 600 à 18 100 UA. Aucune différence n'a été constatée entre les deux groupes.

En seconde infestation, les valeurs ont augmenté encore régulièrement, la moyenne passant de 26 400 à 55 000 UA. Aucune différence n'a été constatée entre les deux groupes.

En troisième infestation, la réponse anticorps était plus élevée puisqu'en moins de 15 jours le titre moyen est passé de 52 000 à 185 000 UA. Le groupe CCS- a montré une tendance à avoir un titre plus élevé. A J14 la différence était significative, avec une valeur de 68 360 UA pour le groupe CCS- et de 52 537 UA pour le groupe CCS+ (Student,  $p=0,04$ ). (Graphique 34).



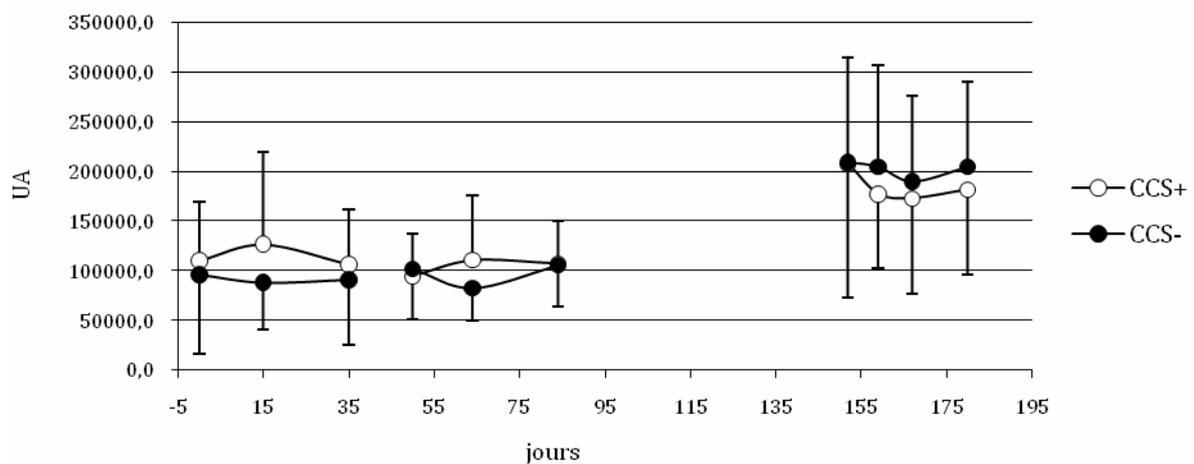
**Graphique 34** : Evolution du taux d'anticorps anti-produit d'excrétion-sécrétion adulte au cours des trois infestations : comparaison des groupes CCS+ et CCS-.

### III.5.5.2. Anticorps anti-L3

En première infestation, comme en seconde infestation, la réponse anticorps a très peu varié. Les valeurs moyennes étaient autour de 10 000 UA. Aucune différence n'a été constatée entre les deux groupes.

En troisième infestation, les titres étaient très élevés dès la première mesure : 103 000 UA en moyenne à J0. Les valeurs sont restées très élevées jusqu'à la fin des prélèvements, sans toutefois montrer de nette augmentation. Le groupe CCS- avait tendance à avoir des valeurs plus élevées, sans que la différence soit significative (Graphique 35).

Résultats du test ELISA anti Larve 3 : comparaison des deux groupes.



**Graphique 35 : Evolution du taux d'anticorps anti-larves L3 au cours des trois infestations : comparaison des groupes CCS+ et CCS-.**

### III.6. Bilan des résultats

Les paramètres pour lesquels des différences significatives (test de Student,  $p < 0,05$ ) ont été remarquées entre les deux groupes sont résumés dans le Tableau 5.

**Tableau 5** : Résumé des différences significatives obtenues entre les valeurs des deux groupes.

Paramètre mesuré	1ère infestation		2ème infestation		3ème infestation	
	Jours où $p < 0,05$	Groupe ayant les valeurs les plus hautes	Jours où $p < 0,05$	Groupe ayant les valeurs les plus hautes	Jours où $p < 0,05$	Groupe ayant les valeurs les plus hautes
<b>Sang</b>						
Leucocytes					J0, J7, J28	CCS+
Neutrophiles	J7	CCS+			J7	CCS+
Eosinophiles					J28	CCS+
% Lymphocytes T					J0	CCS+
% LT CD4			J14	CCS-	J28	CCS-
% LT CD8			J14	CCS+	J28	CCS+
% Monocytes			J34	CCS-	J0	CCS-
% Lymphocytes B			J14, J34	CCS-		
% CD44 élevé			J14	CCS-		
MFI CD44			J14	CCS-		
% CD25			J34	CCS-		
Lymphocytes T			J34	CCS+		
LT CD8+	J14	CCS+	J34	CCS+	J28	CCS+
Rapport CD4/CD8			J14	CCS-	J28	CCS-
Hématocrite	J0, J7, J14	CCS-	J7, J14	CCS-		
Ac E/S adulte					J14	CCS-
% Vers immatures			J34	CCS+		
<b>Nœud lymphatique abomasal</b>						
Poids NL			J34	CCS+		
% Lymphocytes T					J56	CCS-
% LT CD4+					J56	CCS-
% LT CD8+			J34	CCS+	J56	CCS+
Rapport CD4/CD8			J34	CCS-	J56	CCS-
% Lymphocytes B					J56	CCS-
% CD21+					J56	CCS-
% CD5+					J56	CCS+

## **IV. DISCUSSION**

### **IV.1. Comparaison du niveau d'infestation parasitaire entre les deux groupes de sélection**

#### **IV.1.1. Excrétion parasitaire**

L'évaluation du degré d'infestation et donc de l'efficacité de la réponse immunitaire via le degré d'excrétion fécale est largement utilisée ; en effet ces deux paramètres sont bien corrélés entre eux [31-33].

Ici la courbe d'excrétion est classique lors de la réponse primaire, avec un début d'excrétion vers J21 et une augmentation jusqu'à un palier. Les valeurs obtenues lors des comptages d'œufs sont très importantes, et à mettre en relation avec la quantité très importante de larves inoculées (10 000). De tels niveaux d'excrétion ne se rencontrent que lors d'infestations massives.

En seconde infestation les résultats sont très comparables, bien qu'en fin d'infestation les valeurs semblent continuer à augmenter : le palier d'excrétion n'est pas atteint, alors qu'il l'était en première infestation (les dernières séries de mesures ont été réalisées respectivement 35 et 34 jours après l'inoculation des larves lors de la première et de la seconde infestation). Le groupe CCS- semble avoir une tendance à excréter plus, mais ce n'est pas significatif.

En réponse mémoire, le protocole est différent puisque la dose de 10 000 larves est répartie en trois administrations espacées de 7 jours. Ceci permet de stimuler une première fois la réponse immunitaire, et de voir si cela a une influence sur l'installation ou le développement des larves administrées les semaines suivantes. La courbe d'excrétion est donc légèrement différente puisque autour de 21 jours après chaque inoculation la courbe présente une augmentation brutale. Cela correspond au début de la ponte des vers qui se sont développés à partir d'une partie des larves ingérées 21 jours avant, cumulé avec le niveau de ponte déjà présent. Les valeurs se stabilisent ensuite à partir de 38 jours après le début de la troisième infestation.

Les quantités d'œufs rejetés sont largement inférieures à celles obtenues en réponse primaire, probablement à la suite de l'acquisition d'une certaine immunité. Le maximum d'excrétion a été de 6 800 œufs par gramme de fèces en moyenne sur les deux groupes à J56 de la réponse mémoire, contre 11 000 et 10 000 respectivement à J35 et J34 des deux premières infestations (données des 31 animaux). L'acquisition d'une immunité, probablement aidée par le fractionnement de la dose infestante, a contribué à diminuer le niveau d'infestation parasitaire. Contrairement aux infestations précédentes, c'est en réponse mémoire le groupe CCS+ qui montre une tendance à excréter plus (tendance toutefois non significative).

Les écarts types obtenus sont très élevés, dans chacune des trois infestations. Ils sont le signe d'une très forte variabilité individuelle. Par exemple :

- à J35, 2 animaux du groupe CCS- et 3 animaux du groupe CCS+ ont eu un niveau d'excrétion supérieur à 20 000 œufs par gramme. De plus il faut noter que 5 animaux du groupe CCS- et 2 animaux du groupe CCS+ ont dû être vermifugés précocement car ils présentaient des signes cliniques d'haemonchose.
- à J84, 6 animaux du groupe CCS- et 4 animaux du groupe CCS+ ont eu un niveau d'excrétion supérieur à 20 000 œufs par gramme.

*Remarque* : Afin de vérifier qu'il n'y ait pas un effet du père, les individus ayant fortement ou faiblement excrété en fin d'infestation ont été triés selon leur ascendance (Annexes 7 et 8).

En effet, l'héritabilité du niveau d'excrétion d'œufs d'helminthes dans les fèces est assez élevée (0,2 à 0,4) [34].

La conclusion ici est qu'il n'y a pas d'effet du père, chacun ayant donné des fils faiblement, moyennement et fortement excréteurs. La variation interindividuelle constatée est donc *a priori* aléatoire.

- Les différences génétiques entre nos deux groupes d'animaux n'ont induit aucune différence de résistance à l'infestation par *Haemonchus*.

#### **IV.1.2. Pepsinogène sanguin**

La valeur du pepsinogène sanguin est un marqueur des lésions tissulaires de la paroi de la caillette.

L'altération de la perméabilité de la paroi de la caillette est due à la présence des larves dans la muqueuse, qui provoquent des lésions et une réaction inflammatoire locale.

L'augmentation du pepsinogène est donc à corrélérer avec l'infestation parasitaire en général, et plus spécifiquement à la présence des larves dans la muqueuse [33].

C'est en première infestation que l'augmentation du pepsinogène a été la plus spectaculaire. En effet les valeurs sont passées de 0,36 à 1,51 Utyr/ml en 21 jours. Lors des infestations suivantes, une légère augmentation a été notée, bien que les valeurs soient restées autour de 0,6 Utyr/ml. Les deux groupes n'ont montré aucune différence significative.

C'est donc au moment de la première infestation que les lésions de la muqueuse ont été les plus marquées. Dès la seconde infestation des valeurs plus stables du pepsinogène ont montré que la réaction inflammatoire est probablement moindre que précédemment.

Ceci est la preuve de l'installation d'une certaine immunité vis-à-vis des larves, dont le développement et la survie dans la paroi sont diminués.

#### **IV.1.3. Hématocrite**

La valeur de l'hématocrite est directement corrélée au degré d'infestation parasitaire des animaux [35]. En effet *Haemonchus* est hématophage et lorsqu'il est présent en grand nombre provoque une déplétion sanguine non négligeable. Cette spoliation, lorsqu'elle est importante, est à l'origine d'une diminution de l'hématocrite.

A chaque infestation, il a été observé une diminution de l'hématocrite, preuve de la présence de nombreux vers adultes. C'est en première infestation que la diminution a été la plus spectaculaire, allant jusqu'à atteindre 21,9 % à J35 chez le groupe CCS+. A la fin de la première infestation, certains animaux présentant des signes marqués d'anémie ont du être traités avec un antihelminthique plus précocement, de façon à ne pas engager leur pronostic vital.

Lors de ces infestations le groupe CCS- a montré a plusieurs reprises un hématocrite significativement plus élevé que celui du groupe CCS+ (à J0, J7 et J14 en première infestation, et à J7 et J14 en seconde infestation). On peut donc considérer que la déplétion sanguine a été moins forte chez le groupe CCS- ; ce qui pourrait être interprété comme le fait qu'il y aurait moins de vers adultes chez les CCS-. Ce raisonnement n'est cependant pas confirmé par l'excrétion fécale (qui est similaire dans les deux groupes avec une forte variation interindividuelle). De plus une différence est observée dès J0, expliquant peut être la différence observée tout au long de l'infestation : dans ce cas les deux groupes se comporteraient de la même façon, la diminution étant proportionnellement semblable dans les deux groupes, mais le groupe CCS- aurait des valeurs plus élevées de l'hématocrite dès J0. Lors de la troisième infestation cette tendance était toujours présente bien que non statistiquement significative.

Au cours de la première infestation l'hématocrite a diminué de 10,2 % en moyenne, en seconde infestation de 6,3 % et en troisième infestation de 4,4 %. La diminution de plus en plus faible de l'hématocrite montre que les animaux ont acquis une immunité vis-à-vis de *Haemonchus* au cours du temps : les vers adultes étaient moins nombreux, et ainsi, la spoliation sanguine moins importante.

- L'hématocrite était significativement différent d'un groupe à l'autre à plusieurs reprises. Le groupe des moutons résistants aux mammites avait un hématocrite plus élevé.

#### IV.1.4. Bilans parasitaires de fin d'infestation

En premier lieu il faut remarquer que les délais entre la dernière inoculation de vers et l'autopsie sont respectivement de 34 jours et 42 jours en seconde et en troisième infestation.

- Taux d'installation (nombre de vers)

Le taux d'installation était plus faible en fin de troisième infestation (à J56) qu'en fin de seconde infestation (à J34) : 31,9 % contre 44,2 % en moyenne. Ceci montre que les agneaux ont développé une capacité à lutter contre l'installation des vers : ils sont plus aptes à se défendre.

- Longueur de femelles

La longueur des femelles est à corrélérer avec celle de l'utérus, donc de la fécondité. Une longueur faible signifie que la ponte est faible, autrement dit que les défenses de l'hôte ont interféré avec le développement du parasite. Ici la longueur des femelles est moyenne avec respectivement 19,1 et 18,5 mm en fin de seconde et de troisième infestation. Il n'ya pas eu d'effet de la réponse mémoire sur le développement des adultes.

- Pourcentage d'immatures

Les vers immatures nous indiquent aussi l'aptitude de l'hôte à rejeter les parasites. En effet les vers dont la croissance est inhibée par la réponse immunitaire de l'hôte restent sous forme immature, et ne se reproduisent pas.

Ici il y a peu de formes immatures.

En fin de seconde infestation, le groupe CCS+ avait plus d'immatures (en proportion par rapport à la population totale) que le groupe CCS-, ce qui suggère qu'il inhibait mieux la croissance des vers que le groupe CCS-, donc qu'il se défendait mieux contre le parasite.

- Les principaux critères renseignant sur la capacité de l'hôte à se défendre contre l'infestation parasitaire n'étaient pas différents entre les deux groupes d'animaux.

## IV.2. Effecteurs cellulaires de la réponse immunitaire

Nous aborderons successivement l'interprétation des résultats de phénotypage du sang et des cellules ganglionnaires au cours des réponses primaire et secondaire (infestation 1 et 2), puis de la réponse mémoire car les mécanismes qui sont mis en jeu sont sensiblement différents ; il faut toutefois remarquer que la réponse mémoire est probablement active dès la deuxième infestation.

Pour rappel, la réponse à l'infestation par *Haemonchus* fait intervenir à la fois des anticorps et des effecteurs cellulaires tels que les éosinophiles. Les cytokines libérées lors d'infestations parasitaires sont principalement de type Th 2 [36].

### IV.2.1. Réponse immédiate (1<sup>ère</sup> et 2<sup>ème</sup> infestations)

Les cellules mononucléées du sang ou PBMC contiennent principalement les lymphocytes T et B, et les monocytes (qui, après localisation dans les tissus, sont à l'origine des cellules dendritiques et des macrophages). Ici le nombre de PBMC a très fortement augmenté lors de la seconde infestation, bien qu'aucune différence n'ait été observée entre les groupes.

La population sanguine de monocytes a peu évolué pendant les infestations. En seconde infestation le groupe CCS- avait un pourcentage plus élevé de monocytes au sein des cellules mononucléées (cette différence n'était pas significative en nombre de cellules, seulement en pourcentage). Cette différence entre groupes était encore présente en début de réponse mémoire 2 mois après, et s'est ensuite estompée.

Les granulocytes éosinophiles sont supposés constituer une des premières lignes de défense contre les infestations parasitaires par les helminthes. Ils sembleraient tuer les stades larvaires (L3) [37].

Lors d'infestation, ils sont recrutés localement dans les tissus, et participent à la réponse immunitaire non spécifique, qui est généralement d'installation assez rapide (quelques jours). Ici la concentration sanguine en éosinophiles a rapidement augmenté pour atteindre un pic autour du 7<sup>ème</sup> jour, puis diminué dès 21 jours lors des deux premières infestations.

Une plus grande capacité de réponse des lymphocytes T serait contribuerait à la résistance à *Haemonchus* des moutons génétiquement résistants [38]. Alors que la quantité de lymphocytes T dans le sang n'a pas été modifiée par la première infestation, elle a fortement augmenté au cours de la seconde. Cette augmentation a été plus marquée au sein du groupe CCS+. En fin de seconde infestation, la proportion de L<sub>T</sub> parmi les PBMC dans le nœud lymphatique abomasal est légèrement supérieure à celle dans le sang.

- C'est en seconde infestation que la réponse lymphocytaire est la plus importante.

Les lymphocytes CD4, ou lymphocytes auxiliaires (helpers), font partie des premiers effecteurs de la réponse immunitaire spécifique. Après avoir été stimulés par la reconnaissance de l'antigène associé au complexe majeur d'histocompatibilité de classe II présent à la surface d'une cellule présentatrice d'antigènes, les lymphocytes T auxiliaires participent au contrôle à la fois de la réponse des lymphocytes T cytotoxiques (CD8) mais aussi de celle des lymphocytes B.

Une étude [39] a mis en évidence l'importance des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> et  $\gamma\delta$  dans l'immunité acquise lors d'une infestation par *Haemonchus* et leur rôle dans la résistance à l'haemonchose ; les animaux résistants ont plus de L<sub>T</sub> CD4<sup>+</sup> dans la muqueuse abomasale, ce qui suggère qu'une mobilisation locale plus intense de ces cellules permet l'élimination du parasite.

Dans notre étude, la quantité de L<sub>T</sub> CD4<sup>+</sup> est restée stable en première infestation, et a fortement augmenté au moment de la seconde infestation. Il faut noter que la durée est brève entre les deux infestations (15 jours), même si elle permet l'élimination complète des parasites et de la molécule anthelminthique utilisée pour les éliminer est probablement insuffisante pour permettre un retour du système immunitaire à l'état ante.

Au sein des L<sub>T</sub>, les pourcentages de L<sub>T</sub> CD4<sup>+</sup> ont été significativement différents entre les groupes à J14 de la seconde infestation, les valeurs du groupe CCS- étant supérieures. Cependant cette différence n'est pas retrouvée dans le nombre de lymphocytes T CD4<sup>+</sup>.

Dans une étude comparant animaux infestés et non infestés, les populations cellulaires ont été analysées dans le nœud lymphatique, à la suite d'une infestation unique par *Haemonchus* ; les résultats suivants ont été obtenus [28] :

Les populations cellulaires chez les animaux non infestés étaient de 35% de lymphocytes CD4<sup>+</sup> et 16% de lymphocytes CD8<sup>+</sup> ; ainsi que 48% de L<sub>B</sub>, 2% de L<sub>T</sub>  $\gamma\delta$ , 24% de CD25<sup>+</sup> parmi les CD4. Les animaux infestés pendant 27 à 36 jours (une durée qui est comparable à celle de notre étude qui était de 35 jours), avaient des proportions de L<sub>T</sub> CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> (et  $\gamma\delta$ ) significativement inférieures à celles des animaux du groupe contrôle, respectivement 27% et 5,6%.

Lors du phénotypage des cellules du sang nous avons obtenu les proportions suivantes : 21,7% de CD4<sup>+</sup> et 7,9% de CD8<sup>+</sup> en fin de première infestation, résultats assez proches de ceux obtenus dans le nœud lymphatique lors de l'étude citée plus haut.

A la fin de la seconde infestation, dans le nœud lymphatique, les proportions des populations cellulaires étaient de 57,4% de CD4<sup>+</sup>, 10,4% de CD8<sup>+</sup>, 30,3% de L<sub>T</sub>, 11,3% de CD25<sup>+</sup> parmi les CD4, respectivement.

Le pourcentage de L<sub>T</sub> CD4 CD25<sup>+</sup> a tendance à augmenter au cours de la seconde infestation. Le pourcentage de L<sub>T</sub> CD4 CD25<sup>+</sup> est significativement supérieur au sein du groupe CCS- à J14, mais cette évolution n'est pas retrouvée dans le nombre absolu de cellules : c'est le même cas de figure que pour les L<sub>T</sub> CD4<sup>+</sup>.

Les L<sub>T</sub> CD4<sup>+</sup> CD44<sup>+</sup> sont des cellules activées ou mémoires. Le nombre de L<sub>T</sub> CD44<sup>+</sup> a légèrement diminué en seconde infestation, les deux groupes se comportant de façon identique.

Le pourcentage de CD44 était beaucoup plus élevé dans le nœud lymphatique que dans le sang à J34 de la seconde infestation, ce qui traduit une plus grande proportion de lymphocytes activés ou mémoires dans le ganglion drainant par rapport au sang.

Les valeurs de l'intensité de fluorescence du CD44 nous indiquent qu'en seconde infestation (J14), le groupe CCS- exprime plus fortement le CD44 que le groupe CCS+, ou bien que la proportion de cellules exprimant fortement le CD44 est plus élevée, le seuil retenu pour identifier ces cellules étant établi par rapport à un autre marqueur, et donc de façon assez arbitraire (Il n'y a pas chez le mouton de séparation stricte entre une expression basale et augmentée)

Les lymphocytes CD8, aux fonctions cytotoxiques, sont les cellules de la réaction immunitaire de type cellulaire. Ils interviennent en lysant les cellules infectées, par un virus ou une bactérie intracellulaire, grâce à l'interaction Fas/FasL ou la production de perforine/granzyme.

La quantité de lymphocytes CD8<sup>+</sup> a suivi la même évolution que les lymphocytes T CD4<sup>+</sup>. Cependant, à chaque infestation, le groupe CCS+ a une quantité de L<sub>T</sub> CD8<sup>+</sup> supérieure à celle du groupe CCS-. Cela signifie que, pour un même nombre de L<sub>T</sub>CD4<sup>+</sup>, le groupe CCS+ a mobilisé plus de L<sub>T</sub> CD8<sup>+</sup> que le groupe CCS-.

Le groupe CCS+ avait plus de lymphocytes, et plus de lymphocytes CD8<sup>+</sup> que le groupe CCS- en fin de seconde infestation.

Ainsi les valeurs du rapport CD4/CD8 évoluent différemment entre les deux groupes puisque elles sont la conséquence directe des modifications décrites aux paragraphes précédents : en effet le rapport CD4/CD8 évolue inversement du nombre de CD8, qui est à l'origine de sa variation la plus forte.

Nous pouvons affirmer que le rapport CD4/CD8 est surtout influencé par la modification de proportion des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> plutôt que par celle des lymphocytes T CD4<sup>+</sup>.

On remarque alors qu'à l'exception de la première infestation où le rapport était stable, lors des seconde et troisième infestations le groupe CCS+ a un rapport CD4/CD8 plus faible que celui du groupe CCS-.

Il est important de remarquer que cette observation est valable à la fois dans le sang et dans le NL. Il s'agit donc d'un phénomène biologique qui est répétable dans le temps, et entre tissus ; Aucune observation similaire n'a été rapportée jusqu'à présent lors d'infestation par *Haemonchus contortus* chez les ovins.

Nous avons également observé que le groupe CCS- avait une proportion significativement plus élevée de lymphocytes B (CMH II<sup>+</sup>) et de lymphocytes CD4 activés (CD44<sup>+</sup> et CD25<sup>+</sup>) que le groupe CCS+ en seconde infestation (J14).

Les résultats des deux groupes à la fin de la seconde infestation sont différents dans le sang et dans le nœud lymphatique : le groupe CCS- a un pourcentage significativement plus élevé de L<sub>B</sub> dans le sang que le groupe CCS+, alors que dans le nœud lymphatique cette différence n'est pas significative.

- En seconde infestation le pourcentage de L<sub>T</sub> CD4<sup>+</sup> et leur activation sont plus importants chez le groupe CCS-. Par contre, en première et en seconde infestations le groupe CCS+ a plus de L<sub>T</sub> CD8<sup>+</sup>, d'où un rapport CD4/CD8 faible.

#### **IV.2.2. Réponse mémoire (3<sup>ème</sup> infestation)**

Une étude précédente [29] rapporte que lors d'infestation précédée d'une immunisation, la réponse immunitaire dans le nœud lymphatique et dans la muqueuse est différente selon que le mouton héberge des larves dans sa muqueuse ou non. Chez les moutons qui n'hébergent pas de larves, une augmentation transitoire des lymphocytes T  $\gamma\delta$  3 jours après l'infestation et une augmentation des leucocytes 5 jours après l'infestation sont relevées. Au contraire, de nombreux changements affectent les populations cellulaires des moutons ayant des larves tissulaires : dans le nœud lymphatique, les auteurs observent une augmentation des pourcentages de lymphocytes T  $\gamma\delta$ <sup>+</sup>, lymphocytes B, L<sub>T</sub> CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> et L<sub>T</sub> CD4<sup>+</sup> CMH II<sup>+</sup>. Dans la muqueuse, les pourcentages de lymphocytes T  $\gamma\delta$ <sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>, lymphocytes B augmentent aussi. Les éosinophiles étaient aussi fortement augmentés. La réponse à l'infestation larvaire consiste donc en une activation spécifique des lymphocytes CD4<sup>+</sup>.

Les auteurs mettent en relation ces deux types de réponse avec l'expulsion rapide ou l'expulsion différée des larves.

Dans notre étude, le nombre de granulocytes éosinophiles a augmenté en réponse mémoire. Les valeurs étaient plus élevées que lors des infestations précédentes. Les valeurs des deux groupes ont été différentes, et le groupe CCS+ a eu une concentration significativement plus élevée que le groupe CCS- à J28. La réponse non spécifique est toujours présente en réponse mémoire, et la quantité d'éosinophiles est plus importante que lors des infestations précédentes.

En réponse mémoire, la quantité de lymphocytes T dans le sang est restée stable et identique pour les deux groupes. Dans le nœud lymphatique la proportion de lymphocytes T était beaucoup plus grande qu'à la fin de l'infestation précédente : 48,9% contre 32,4%. Contrairement aux résultats obtenus dans le sang, le groupe CCS- a présenté une plus grande proportion de  $L_T$  que le groupe CCS+.

Les pourcentages de CD4 dans le sang étaient significativement différents entre les groupes à J28 de la troisième infestation, le groupe CCS- ayant une plus grande proportion de  $L_T CD4^+$  (comme en seconde infestation). De même, au dernier jour de la troisième infestation, dans le nœud lymphatique cette fois, le groupe CCS- avait significativement plus de  $L_T CD4^+$  que le groupe CCS+.

Les  $L_T$  exprimant le CD25 sont des  $L_T$  récemment activés ou de phénotype régulateur.

En réponse mémoire le recrutement des  $L_T$  activés dans le nœud lymphatique est particulièrement élevé : le pourcentage de  $L_T CD4^+ CD25^+$  a presque doublé entre J34 de la seconde infestation et J56 de la troisième infestation.

L'intensité d'expression du marqueur CD44 a doublé entre les deux infestations : 51,3 à J34 de la seconde infestation et 103,9 à J56 de la troisième infestation.

Il faut noter que les valeurs de l'intensité de fluorescence dans le nœud lymphatique sont largement inférieures à celles dans le sang.

La quantité de  $L_T CD8^+$  a diminué en réponse mémoire. Le groupe CCS+ a, dans le sang comme dans le nœud lymphatique, une quantité plus importante de  $L_T CD8^+$ . Il a aussi un rapport CD4/CD8 significativement plus faible (comme en seconde infestation).

Les  $L_B$  sont les cellules responsables de la réponse humorale, après leur interaction via les interleukines (IL-4 et IL-10) sécrétées par les  $L_T CD4^+$ . Ils peuvent alors se différencier en plasmocytes qui produisent des immunoglobulines spécifiques de l'agent infectieux. Certains  $L_B$  ont une durée de vie plus longue et sont des  $L_B$  mémoires. Les  $L_B$  sont très importants dans la réponse immunitaire mémoire, lorsque les anticorps sont actifs, car ils ont une capacité de réponse à la fois ciblée et rapide contre l'agent infectieux.

Une étude précédente a montré que ce sont les lymphocytes B (et non les cellules dendritiques ni les monocytes) qui semblent jouer le rôle de cellules présentatrices d'antigènes dans la réponse lymphocytaire induite par les antigènes de *Haemonchus* [40].

Dans notre étude, la population sanguine de lymphocytes B a légèrement diminué au cours de chaque infestation, ainsi que d'une infestation à l'autre (les valeurs rencontrées en seconde infestation étaient supérieures à celles en troisième infestation). Cette évolution du nombre de  $L_B$  est peut être liée à l'âge des animaux. Par contre, dans le nœud lymphatique le pourcentage de  $L_B$  est sensiblement identique en fin de seconde et en fin de troisième infestation.

A la fin de la troisième infestation, dans le nœud lymphatique, le groupe CCS- avait un pourcentage de lymphocytes B significativement supérieur à celui du groupe CCS+.

Le CD5 et le CD21 correspondent à deux populations exclusives de lymphocytes B.

Les valeurs ont peu évolué au cours de la troisième infestation.

Dans le nœud lymphatique, en fin de réponse mémoire le groupe CCS+ a eu un pourcentage de cellules CD21<sup>+</sup> significativement plus élevé que celui du groupe CCS-. De plus le pourcentage moyen était plus élevé que celui dans le sang, mesuré 28 jours avant.

Dans le nœud lymphatique, le groupe CCS- avait un pourcentage de CD5 significativement plus élevé que celui du groupe CCS+ à J56. Le pourcentage moyen en fin de réponse mémoire (J56) est comparable à celui dans le sang à J28.

Les différences obtenues dans les populations de lymphocytes B dans le nœud lymphatique en fin de troisième infestation n'ont pas été retrouvées dans le sang au cours de l'infestation.

Les L<sub>T</sub> γδ, non restreints au CMH, étaient moins nombreux en troisième infestation qu'en seconde infestation. Il n'y a pas eu d'évolution au sein des infestations, et les valeurs des deux groupes étaient proches.

C'est en réponse mémoire que la réponse anticorps est la plus marquée. Ces résultats sont en accord avec les études déjà réalisées sur le sujet [41, 42].

Les profils des deux réponses anticorps sont différents. La réponse dirigée contre les produits d'excrétion-sécrétion augmente au cours de la seconde et de la troisième infestation d'une part, et a une intensité plus forte en réponse mémoire d'autre part. La réponse dirigée contre les antigènes de larve L3, quant à elle, démarre tout de suite beaucoup plus fortement en réponse mémoire, mais n'augmente pas en intensité pendant les infestations.

Le groupe CCS- a des taux plus élevés que le groupe CCS+ (à J14) en ce qui concerne les anticorps dirigés contre les produits d'excrétion-sécrétion. Aucune différence entre les groupes n'a été remarquée en ce qui concerne les anticorps anti-L3.

Des études précédentes ont montré que les immunoglobulines produites lors d'infestation par *Haemonchus* sont principalement des IgG1 mais aussi des IgG2, en quantité moindre [43]. Les IgG1 et les IgA joueraient un rôle dans la résistance génétique à l'haemonchose [44].

Une étude sur la résistance génétique à *Haemonchus* a montré que celle-ci se manifeste lors de la réponse mémoire, après activation du système immunitaire par un contact avec le parasite et maturation des effecteurs [45] : il s'agit d'une réponse immune acquise, qui fait principalement intervenir les anticorps dirigés contre le parasite.



## CONCLUSION

Les résultats ont été obtenus principalement sur le sang, mais aussi à deux reprises sur le nœud lymphatique. L'étude de la réponse immunitaire dans le sang nous a permis de tracer une cinétique des différentes populations dans le temps, ce qui est très intéressant pour la compréhension des mécanismes immunitaires qui sont déclenchés par la présence de *Haemonchus*. L'étude dans le nœud lymphatique nous permet de situer nos résultats par rapport à d'autres publications. De plus, il apparaît que les différences entre les groupes, ainsi que certains recrutements de cellules, sont plus marqués dans le nœud lymphatique.

La comparaison de nos deux groupes est intéressante, et des différences ont été observées dans la mobilisation de certains effecteurs immunitaires. Les points les plus remarquables concernent les populations de lymphocytes T et B en réponse mémoire. Le groupe des moutons résistants aux mammites (CCS-) a, à plusieurs reprises et dès la première infestation, un nombre plus faible de  $L_T CD8^+$  et un ratio CD4/CD8 plus élevé que l'autre groupe. Le recrutement de lymphocytes B était plus important chez le groupe CCS-.

Cependant les paramètres tels que l'excrétion fécale ou les niveaux d'installation et de reproduction, montrent que les groupes ont le même niveau de résistance face à l'infestation parasitaire par *Haemonchus*.

On peut donc dire que la sélection pour une résistance accrue aux mammites n'a pas entraîné de différence de résistance à l'infestation par *Haemonchus contortus*, mais on remarque que les mécanismes immunitaires mis en jeu lors de la réponse mémoire sont sensiblement différents. La sélection sur le critère CCS a modifié les capacités de réponse immunitaire des animaux. Cependant les événements à l'origine de ces différences restent encore à explorer.

**AGREMENT ADMINISTRATIF**

Je soussigné, A. MILON, Directeur de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse, certifie que

**Melle Hélène, Nicole, Madeleine PFEIFFER**

a été admis(e) sur concours en : 2002

a obtenu son certificat de fin de scolarité le : 12/07/07

n'a plus aucun stage, ni enseignement optionnel à valider.

**AGREMENT SCIENTIFIQUE**

Je soussigné, Gilles FOUCRAS, Docteur de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse,

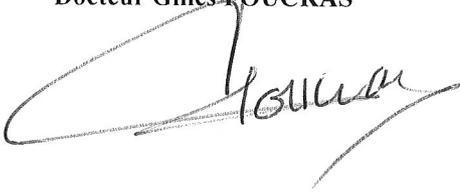
autorise la soutenance de la thèse de :

**Melle Hélène, Nicole, Madeleine PFEIFFER**

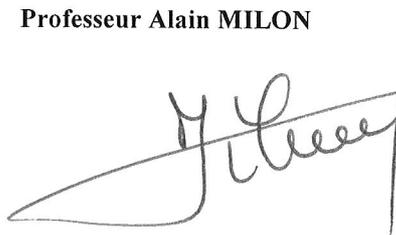
intitulée :

*Sélection génétique pour une résistance accrue aux mammites : Effets sur la réponse à l'infestation par Haemonchus contortus*

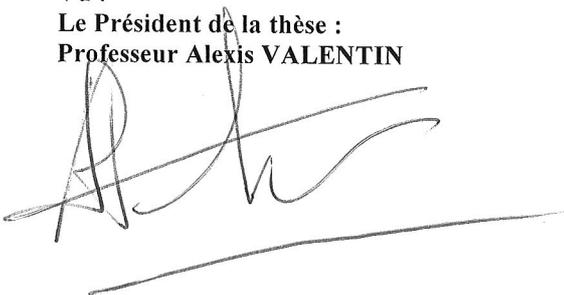
**Le Professeur  
de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse  
Docteur Gilles FOUCRAS**



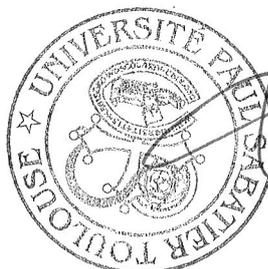
**Vu :  
Le Directeur  
de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse  
Professeur Alain MILON**



**Vu :  
Le Président de la thèse :  
Professeur Alexis VALENTIN**



**Vu le :  
Le Président  
de l'Université Paul Sabatier  
Professeur Jean-François SAUTEREAU**



## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. CONTRERASA, A., SIERRAB, B., SANCHESA, A., et al., *Mastitis in small ruminants*. Small Ruminant Research, 2007. **68**(1-2): p. 145-153.
2. BERGONIER, D., DE CREMOUX, R., RUPP, R., LAGRIFFOUL, G., BERTHELOT, X., *Mastitis of dairy small ruminants*. Veterinary Research, 2003. **34**(5): p. 689-716.
3. BERGONIER, D., BERTHELOT, X., *New advances in epizootiology and control of ewe mastitis*. Livestock Production Science, 2003. **79**(1): p. 1-16.
4. BISHOP, S.C., MORRIS, A., *Genetics of disease resistance in sheep and goats*. Small Ruminant Research, 2007. **70**(1): p. 48-59
5. HAENLEIN, G.F.W., *About the evolution of goat and sheep milk production*. Small Ruminant Research, 2007. **68**(1-2): p. 3-6.
6. BARILLET, F., *Genetic improvement for dairy production in sheep and goats*. Small Ruminant Research, 2007. **70**(1): p. 60-75.
7. MAVROGENISA, A.P., KOUMASA, A., KAKOYIANNISB, C.K., TALLOTIS, C.H., *Use of somatic cell counts for the detection of subclinical mastitis in sheep*. Small Ruminant Research, 1995. **17**(1): p. 79-84.
8. ZAJAC, A.M., *Gastrointestinal nematodes of small ruminants: life cycle, anthelmintics, and diagnosis*. Vet. Clin. North. Am. Food Anim. Pract., 2006. **22**(3): p. 529-41.
9. KAPLAN, R.M., *Drug resistance in nematodes of veterinary importance: a status report*. Trends in parasitology, 2004. **20**(10): p. 477-81.
10. JABBAR, A., IQBAL, Z., KERBOEUF, D., MUHAMMAD, G., KHAN, M.N., AFAQ, M., *Anthelmintic resistance: The state of play revisited*. Life Sciences, 2006. **79**(26): p. 2413-2431.
11. MILLER, J.E., HOROHOV, D.W., *Immunological aspects of nematode parasite control in sheep*. Journal of Animal Science, 2006. **84**(Suppl:E): p. 124-32.
12. SHOOK, G.E., *Selection for disease resistance*. Journal of Dairy Science, 1989 **72**(5): p. 1349-62.
13. STEARS, M.J., BISHOP, S.C., MAILLARD, B.A., RAADSMA, H., *The sustainability, feasibility and desirability of breeding livestock for disease resistance*. Research in veterinary science, 2001. **71**: p. 1-7.
14. DEKKERS, J.C.M., MAILLARD, B.A., LESLIE, K.E., *Workshop : genetic improvement of resistance to mastitis of dairy cattle with special emphasis on somatic cell count*. Journal of Dairy Science, 1994. **77**: p. 616-618.
15. MACKENZIE, K., BISHOP, S.C., *Utilizing stochastic genetic epidemiological models to quantify the impact of selection for resistance to infectious diseases in domestic livestock*. Journal of Animal Science, 2001. **79**: p. 2057-2065.

16. SPRINGBETT, A.J., MACKENZIE, K., WOOLLIAMS, J.A., BISHOP, S.C. , *The contribution of genetic diversity to the spread of infectious diseases in livestock populations*. Genetics, 2003. **165**: p. 1465-1474.
17. RAYNAL-LJUTOVAC, K., PIRISI, A., DE CREMOUX, R., GONZALO, C., *Somatic cells of goat and sheep milk: Analytical, sanitary, productive and technological aspects*. Small Ruminant Research 2007. **68**(1-2): p. 126-144.
18. SHOOK, G.E., SCHULTZ, M.M., *Selection on somatic cell score to improve resistance to mastitis in the United States*. Journal of Dairy Science, 1994. **77**(2): p. 648-58.
19. KOIVULA, M., NEGUSSIE, E., MANTYSAARI, E.A., *Genetic parameters for test-day somatic cell count at different lactation stages of Finnish dairy cattle*. Livestock Production Science, 2004. **90**(2-3): p. 145-157.
20. PHILIPSSON, J., RAL, G., BERGLUND, B., *Somatic cell count as a selection criterion for mastitis resistance in dairy cattle*. Livestock Production Science, 1995. **41**(3): p. 195-200.
21. SERRANO, M., PEREZ-GUZMAN, M.D., MONTORO, V., JURADO. J.J., *Genetic analysis of somatic cell count and milk traits in Manchega ewes*. Livestock Production Science, 2003. **84**(1): p. 1-10.
22. BARILLET, F., RUPP, R., MIGNON-GRASTEAU, S., ASTRUC, J.M., JACQUIN, M., *Genetic analysis for mastitis resistance and milk somatic cell score in French Lacaune dairy sheep*. Genetics, selection, evolution., 2001. **33**(4): p. 397-415.
23. KAPLAN, R.M., BURKEB, J.M., TERRILLC, T.H., et al., *Validation of the FAMACHA® eye color chart for detecting clinical anemia in sheep and goats on farms in the southern United States*. Veterinary Parasitology, 2004. **123**(1-2): p. 105-120.
24. GILL, H.S., ALTMANN, K., CROSS, M.L., HUSBAND, A.J., *Induction of T helper 1- and T helper 2-type immune responses during Haemonchus contortus infection in sheep*. Immunology, 2000. **99**(3): p. 458-63.
25. PENA, M.T., MILLER, J.E., HOROHOV, D.W., *Effect of CD4(+) T lymphocyte depletion on resistance of Gulf Coast Native lambs to Haemonchus contortus infection*. Veterinary Parasitology, 2006.
26. RIFFKIN, G.G., DOBSON, C., *Predicting resistance of sheep to Haemonchus contortus infections*. Veterinary Parasitology, 1979. **5**(4): p. 365-378.
27. SCHALLIG, H.D., *Immunological responses of sheep to Haemonchus contortus*. Parasitology, 2000. **120 Suppl**: p. S63-72.
28. BALIC, A., BOWLES, V.M., MEEUSEN, E.N.T., *Cellular profiles in the abomasal mucosa and lymph node during primary infection with Haemonchus contortus in sheep*. Veterinary immunology and immunopathology, 2000. **75**: p. 109-120.

29. BALIC, A., BOWLES, V.M., MEEUSEN, E.N., *Mechanisms of immunity to Haemonchus contortus infection in sheep*. Parasite Immunology, 2002. **24**(1): p. 39-46.
30. LUFFAU, G., PERY, P., CARRAT, C., *Interference between anthelmintics and immunity in gastrointestinal strongylosis of sheep*. Ann Rech Vet, 1985. **16**(1): p. 17-23.
31. BALLWEBER, L.R., *Diagnostic methods for parasitic infections in livestock*. Vet. Clin. North. Am. Food Anim. Pract., 2006 **22**(3): p. 695-705.
32. CABARET, J., GASNIER, N., JACQUIET, P., *Faecal egg counts are representative of digestive-tract strongyle worm burdens in sheep and goats*. Parasite, 1998. **5**(2): p. 137-42.
33. EYSKER, M., PLOEGER, H.W., *Value of present diagnostic methods for gastrointestinal nematode infections in ruminants*. Parasitology, 2000. **120**(Suppl:S): p. 109-19.
34. WINDON, R.G., *Genetic control of resistance to helminths in sheep*. Vet Immunol Immunopathol, 1996. **54**(1-4): p. 245-54.
35. LE JAMBRE, L.F., *Relationship of blood loss to worm numbers, biomass and egg production in Haemonchus infected sheep*. International Journal for Parasitology, 1995. **25**(3): p. 269-73.
36. MEEUSEN, E.N.T., BALIC, A., BOWLES, V., *Cells, cytokines and other molecules associated with rejection of gastrointestinal nematode parasites*. Veterinary Immunology and Immunopathology, 2005. **108**(1-2): p. 121-125.
37. MEEUSEN, E.N.T., BALIC, A., *Do eosinophils have a role in the killing of helminth parasites?* Parasitol.Today, 2000. **16**(3): p. 95-101.
38. GILL, H.S., COLDITZ, I. G., WATSON, D. L., *Immune responsiveness of lambs selected for resistance to haemonchosis*. Res Vet Sci, 1993. **54**(3): p. 361-5.
39. MUNOZ-GUZMAN, M.A., DOMINGUEZ, M.R., BUENDIA, J.A., ALBA-HURTADO, F. *Post-infection increase of CD4+ and gamma delta lymphocytes in the abomasal mucosa of haemonchosis resistant lambs*. in 2d European Veterinary Immunology Workshop. 2006. Paris, France.
40. TORGERSON, P.R., LLOYD, S., *The B cell dependence of Haemonchus contortus antigen-induced lymphocyte proliferation*. Int J Parasitol, 1993. **23**(7): p. 925-30.
41. CHARLEY-POULAIN, J., LUFFAU, G., PERY, P., *Serum and abomasal antibody response of sheep to infections with Haemonchus contortus*. Vet Parasitol, 1984. **14**(2): p. 129-41.
42. SCHAGILLA, H.D.F.H., MOYEOB, et al., *Bovine humoral immune responses to Haemonchus placei excretory secretory antigens*. Veterinary Parasitology, 1996. **65**(3-4): p. 289-296.

43. SCHALLIG, H.D., VAN LEEUWEN, M. A., HENDRIKX, W. M., *Isotype-specific serum antibody responses of sheep to Haemonchus contortus antigens.* Vet Parasitol, 1995. **56**(1-3): p. 149-62.
44. GILL, H.S., GRAY, G. D., WATSON, D. L., HUSBAND, A. J., *Isotype-specific antibody responses to Haemonchus contortus in genetically resistant sheep.* Parasite Immunol, 1993. **15**(2): p. 61-7.
45. GILL, H.S., *Genetic control of acquired resistance to haemonchosis in Merino lambs.* Parasite Immunol, 1991. **13**(6): p. 617-28.

## **ANNEXES**

### **Annexe 1 : Comptage des œufs de *Haemonchus* dans les fèces par la méthode de Mac Master.**

Trois grammes de matières fécales sont pesées puis délitées dans 45 ml de solution saline. La solution obtenue est filtrée à la passoire fine puis quelques millilitres sont prélevés au compte gouttes et déposés sur la lame spécifique préalablement humidifiée.

Le comptage des œufs de nématodes se fait ensuite, au grossissement x 10.

Comptage sur toute la lame : le résultat est multiplié par 15 pour avoir le nombre d'OPG.

Comptage au sein de la grille : le résultat est multiplié par 50 pour avoir le nombre d'OPG.

### **Annexe 2 : Extraction des PBMC par la méthode du gradient de Ficoll.**

L'extraction est réalisée sous hotte, dans des conditions stériles.

Le sang prélevé sur citrate est dilué de moitié dans du HBSS : à partir de 5 ml de sang on complète à 10 ml avec du HBSS.

Ensuite, déposer 9 ml du sang dilué sur 5 ml de Ficoll, puis mettre à centrifuger 20 min à 20 °C, à 1200g, accélération 9, décélération 1.

Prélever l'anneau de cellules, compléter à 10 ml avec du HBSS puis mettre à centrifuger 10 min à 4°C, à 860g, accélération 8, décélération 6.

Récupérer le culot, ajouter 1 ml d'ACK, laisser agir 3 min, compléter à 10 ml avec du HBSS puis centrifuger 10 min à 4°C, à 860g, accélération 8, décélération 6.

Récupérer le culot, laver avec 10 ml de HBSS puis centrifuger 10 min à 860g, accélération 8, décélération 6.

Récupérer le culot, re-suspendre dans 2 ml de HBSS.

Prélever 300 µl pour le comptage et le FACS, garder le reste pour le congeler.

### **Annexe 3 : Protocole de marquage des PBMC.**

Sur une plaque à micropuits, on dépose 100 µL de cellules dans chaque puits.

On centrifuge ensuite 5 min à 4°C, à 400g.

Éliminer le surnageant par retournement de la plaque

Déposer 50 µL de solution d'anticorps dans chaque puits (sauf non marqué : ajouter du tampon FACS), laisser incuber 15 minutes au froid et à l'obscurité.

Ajouter 100 µL de tampon FACS dans chaque puits

Centrifuger 5 min à 4°C, à 400g

Éliminer le surnageant par retournement de la plaque

Déposer 200 µL de tampon FACS dans chaque puits

Centrifuger 5 min à 4°C, à 400g

Éliminer le surnageant par retournement de la plaque

Resuspendre les cellules dans 200 µL de tampon FACS, transférer en micro tubes

Analyser les cellules au cytomètre.

#### Annexe 4 : Caractéristiques techniques des anticorps utilisés.

NOM	Code	Numéro du clone	Isotype	Concentration utilisée
CD <sub>2</sub>	MCA1498	I/35A	IgG1	1/100
CD <sub>4</sub>	MCA2213F	44.38	IgG2a	1/100
CD <sub>8</sub>	MCA16574PE	CC58	IgG1	1/20
CD <sub>5</sub>	MCA835A647	CC17	IgG1	1/50
CD <sub>21</sub>	MCA1424F	CC21	IgG1	1/10
CD <sub>25</sub>	MCA8818F	9.14	IgG1	1/100
CD <sub>44</sub>	MCA2219F	25.32	IgG1	1/100
CD <sub>14</sub>	VPM65		IgG1	1/300
MHCII	MCA2225PE	28.1	IgG1	1/50
WC <sub>1</sub>	MCA838F	CC15	IgG2a	1/50

#### Annexe 5 : Dosage du pepsinogène réalisé à partir du sérum par la méthode décrite par Dorny et Vercruyse (1998).

Un échantillon de sérum a été acidifié avec de l'acide chlorhydrique en présence de l'albumine sérique bovine (BSA) et incubé à 37°C pendant une nuit. La réaction est stoppée avec de l'acide trichloracétique (TCA) à 4 % et le mélange centrifugé à 14.000 tours/min pendant 5 minutes. Un aliquote du surnageant est ajouté à 0,25M de NaOH et les plaques sont incubées à température ambiante pendant 30 minutes. La quantité de tyrosine libérée a été évaluée par absorption à la longueur d'onde de 680 nm et les valeurs ont été exprimées en mU tyrosine/litre de sérum.

#### Annexe 6 : Lecture des ELISA.

La lecture des résultats des tests ELISA est assez complexe. Elle fait intervenir un standard de référence dont le titre en anticorps est connu. Ce standard est dilué plusieurs fois au tiers. Son titre étant connu, on peut relier graphiquement le titre en anticorps et la densité optique obtenue. Cela donne une courbe avec une partie droite, qui sera utilisée pour la lecture des échantillons.

Les échantillons sont dilués au 1:1000<sup>ème</sup> puis passés en ELISA. La densité optique des échantillons est lue. Puis grâce à la courbe standard qui nous donne la relation entre densité optique et titre, on obtient par lecture graphique le titre en anticorps de l'échantillon.

**Annexe 7 : répartition des individus fortement excréteurs selon leurs pères.**

pères	53 animaux			31 animaux	
	Nombre de fils	1ère infestation	2ème infestation	Nombre de fils	3ème infestation
		Nombre de fils dont opg >15 000	Nombre de fils dont opg >15 000		Nombre de fils dont opg >10 000
<i>1</i>	5	2	<u>1</u>	3	1
<i>2</i>	9	2	<u>2</u>	5	<u>1</u>
<i>3</i>	8	2	<u>1</u>	5	<u>1</u>
<i>4</i>	5	4	<u>2</u>	2	2
Total CCS+	27	10	6	15	5
<i>5</i>	12	3	3	7	3
<i>6</i>	3	0	1	2	0
<i>7</i>	10	3	<u>2</u>	6	2
<i>8</i>	1	0	0	1	0
Total CCS-	26	6	6	16	6

Légende :

En caractères italiques : pères dont au moins un fils a du être précocement vermifugé en fin de première infestation à cause de signes cliniques de parasitose.

En caractères soulignés : Animaux ayant déjà été fortement excréteurs en fin d'infestation précédente.

**Annexe 8 : répartition des individus faiblement excréteurs selon leurs pères.**

pères	53 animaux			31 animaux	
	Nombre de fils	<b>1ère infestation</b>	<b>2ème infestation</b>	Nombre de fils	<b>3ème infestation</b>
		Nombre de fils dont opg <5 000	Nombre de fils dont opg <5 000		Nombre de fils dont opg <5 000
1	5	0	<b>2</b>	3	1
2	9	1	3 ( <u>1</u> )	5	3 ( <u>1</u> )
3	8	2	1	5	1
4	5	1	<b>1</b>	2	0
Total CCS+	27	4	7	15	5
5	12	2	0	7	3 ( <b>1</b> )
6	3	0	2	2	<u>2</u>
7	10	3	3 ( <u>1</u> )	6	<u>3</u>
8	1	0	0	1	1
Total CCS-	26	5	5	16	9

Légende :

En caractères soulignés : Animaux ayant déjà été faiblement excréteurs en fin d'infestation précédente.

En caractères gras : Animaux qui étaient fortement excréteurs en fin d'infestation précédente.

AGREMENT ADMINISTRATIF

Je soussigné, A. MILON, Directeur de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse, certifie que

**Melle Hélène, Nicole, Madeleine PFEIFFER**

a été admis(e) sur concours en : 2002

a obtenu son certificat de fin de scolarité le : 12/07/07

n'a plus aucun stage, ni enseignement optionnel à valider.

AGREMENT SCIENTIFIQUE

Je soussigné, Gilles FOUCRAS, Docteur de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse,

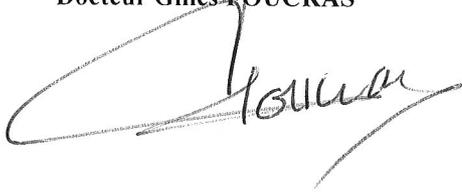
autorise la soutenance de la thèse de :

**Melle Hélène, Nicole, Madeleine PFEIFFER**

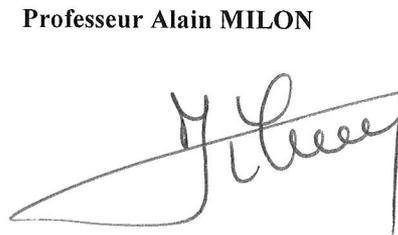
intitulée :

*Sélection génétique pour une résistance accrue aux mammites : Effets sur la réponse à l'infestation par Haemonchus contortus*

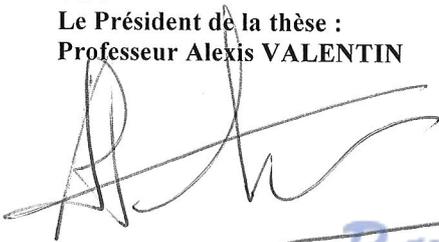
Le Professeur  
de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse  
Docteur Gilles FOUCRAS



Vu :  
Le Directeur  
de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse  
Professeur Alain MILON



Vu :  
Le Président de la thèse :  
Professeur Alexis VALENTIN



Vu le :  
Le Président  
de l'Université Paul Sabatier  
Professeur Jean-François SAUTEREAU



NOM : PFEIFFER

PRENOM : Hélène

TITRE :

SELECTION GENETIQUE POUR UNE RESISTANCE ACCRUE AUX MAMMITES : EFFET SUR L'INFESTATION PAR *Haemonchus contortus*.

RESUME :

L'objectif de cette étude était de déterminer si la sélection génétique sur le critère du comptage des cellules somatiques (CCS) dans le lait avait un impact sur la résistance vis-à-vis du parasitisme gastro-intestinal chez les ovins. Pour cela, deux groupes de moutons, issus d'une sélection divergente ont été comparés au cours de trois infestations expérimentales successives par le nématode *Haemonchus contortus*. Grâce à diverses analyses immunitaires et parasitaires, les auteurs ont montré que le contrôle de l'infestation est comparable entre les deux lignées bien que certains effecteurs de la réponse immunitaire soient mobilisés différemment.

MOTS CLES :

Génétique ; Immunité ; Sélection ; Mammite ; Haemonchus

ENGLISH TITLE:

GENETIC SELECTION FOR AN ENHANCED RESISTANCE TO MASTITIS: EFFECT ON THE RESPONSE TO THE INFECTION WITH *Haemonchus contortus*.

ABSTRACT:

The aim of the study was to determine if genetic selection on the milk Somatic Cell Count (SCC) criterion influences the resistance of sheep to gastrointestinal parasitism. For that purpose, two groups of sheep from a divergent selection were examined after three consecutive oral inoculations with *Haemonchus contortus* nematode. After analysis of several immunological and parasitic parameters, we concluded that control of the infection is comparable between the groups, although some immune effectors seem differentially mobilized.

KEYWORDS:

Genetic; Selection; Immunity; Mastitis; Haemonchus